

博士論文

論文題目 ペプチダーゼプローブ使用による原発性肺癌の
迅速蛍光イメージングに関する研究

氏名 日野 春秋

博士論文

ペプチダーゼプローブ使用による原発性肺癌の
迅速蛍光イメージングに関する研究

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教官

中島 淳

申請者

日野 春秋

目次	ページ
要旨	1
第1章 序論	
第1節 ペプチダーゼ蛍光プローブについて	3
第2節 呼吸器外科領域における肺癌診断の現状と課題	7
第3節 本研究の目的	8
第2章 ヒト肺癌細胞株における検討	
第1節 生細胞イメージング	10
第2節 ライセートアッセイ	14
第3節 qRT-PCR による GGT1 発現の検討	16
第4節 siRNA 導入株における検討	19
第3章 肺癌モデルマウスにおける検討	
第1節 肺癌モデルマウスの作成	25
第2節 肺癌モデルマウスの蛍光画像、及び病理組織学的検討	27
小括 1	30
第4章 ヒト肺癌手術検体を用いた検討	
第1節 肺癌組織及び正常肺における蛍光画像の取得	32
第2節 蛍光画像の解析及び臨床病理学的検討	37
第3節 免疫組織染色による検討	46
小括 2	50
Discussion	51
第5章 総括、今後の課題・展望	
第1節 総括	55
第2節 今後の課題・展望	56
参考文献	61
研究倫理申請・学会発表	68
謝辞	69

要旨

ペプチダーゼプローブを用いた蛍光イメージングが、肺癌の診断に応用可能であるか検討した。蛍光プローブは、 γ -glutamyltranspeptidase (GGT) に反応する γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を用いた。肺癌細胞株の検討では、GGT1 (GGT の subtype) を高発現する A549、H460、H441 では、癌細胞を検出でき、発現の少ない H82、H226 では検出できなかった。A549 肺癌モデルマウスの検討では、リンパ節転移、播種病変を 15 分程度で認識できた。肺癌手術検体の検討では、感度/特異度 43.8%/84.9%であった。

第 1 章

序論

第1章 序論

第1節 ペプチダーゼ蛍光プローブについて

蛍光プローブとは、標的分子と結合または反応することで、その分子内での構造変化により、強い蛍光を放出したり、波長が変わるなどの変化を示す機能性の蛍光物質のことである。標的分子が、生体内の代謝やシグナル伝達などに関わるものであれば、生体内の起きている現象について、蛍光を用いてリアルタイムにそれらを可視化することが可能である。こうした技術は、病態解明や創薬開発、そして癌の診断に使用するなど様々な領域に応用の可能性を秘めている。既存のプローブに関しては、これまでにさまざまな蛍光物質、蛍光プローブが研究、開発されてきた[1]。例えば、COX2 (cyclo-oxygenase-2) 特異的蛍光プローブ、低酸素を検出する蛍光プローブ、また HER2 レセプター抗体 (トラスツズマブ) を接合した蛍光プローブなど、癌のイメージングを可能にするさまざまな蛍光物質が創製されてきた [2, 3, 4]。その中でも、Indocyanine green (ICG) は、肺癌のセンチネルリンパ節を同定するために用いられ、[5] 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) はグリオブラストーマ (脳腫瘍) の遺残を見つけるために実際の医療現場で使用されている[6]。しかし、こうした使用報告例は数少ない。浦野らは、各種ペプチダーゼに対する高感度蛍光プローブを新規に開発し、癌細胞や腹膜播種モデルマウスに適用することで、微小癌の蛍光イメージングを可能にした[7]。開発したペプチダーゼ蛍光プローブの特徴は、pH7.4 前後の中性付近では無色透明であるが、癌に特異的に発現している酵素と反応することで、蛍光物質が

癌細胞に取り込まれ、強い蛍光として正常細胞と癌細胞を識別することができるという性質である。また、その反応速度は速く、数分からその蛍光を認識することができる。この新規に開発されたペプチダーゼプローブは、リアルタイムに癌の領域をすばやく識別できる利点があり、今までにはない診断方法としての可能性をもっている。

本研究において、ペプチダーゼプローブとして、 γ -glutamyltranspeptidase (GGT) の酵素活性を検出する、 γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を用いた (Figure 1-1)。gGlu-HMRG のターゲットとなる酵素、GGT は臨床的には、肝胆道系疾患の逸脱酵素として、血清検査の項目として知られている。人の正常組織の中で、GGT を高発現している臓器としては、肝内胆管上皮をはじめ、腎臓近位尿細管、男性性生殖系臓器、マクロファージなどが知られている [8]。一方で、GGT は、乳癌、甲状腺癌、肺癌などヒトの様々な癌腫にも高発現しており、グルタチオン (主に GGT1) やロイコトリエン (主に GGT5) の代謝に関わり、酸化ストレスに対する防御機能の 1 つを担っているとされる [9, 10, 11]。癌細胞においては、新たに獲得する抗癌剤耐性や細胞増殖に関与し、ras 遺伝子が GGT 発現をコントロールしているとも報告されている [12-16]。gGlu-HMRG は、中性付近では無色透明であるが、癌細胞の膜上に発現している GGT と酵素反応すると、 γ 位のグルタミン酸が加水分解を受け、高蛍光性の HMRG に変換される。そこで、疎水性が上昇することにより、HMRG は細胞内に蓄積し、癌細胞を蛍光として認識することができる (Figure 1-2) [7]。このペプチダーゼプローブを局所に滴下するという極めて簡易な方法で、数ミリ単位の微小浸潤癌で

も蛍光として識別することが可能である。

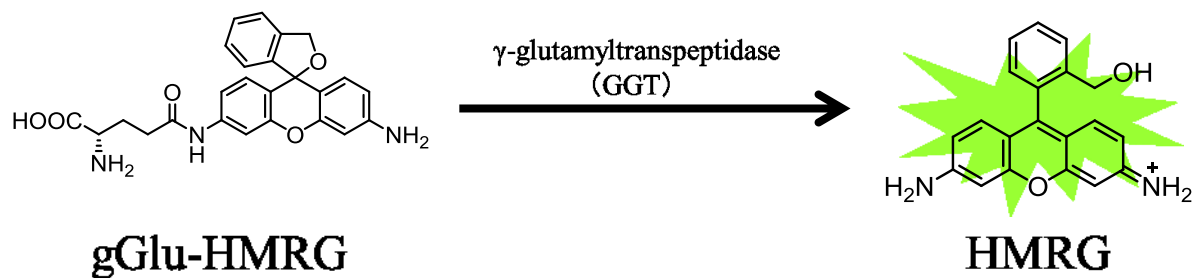


Figure 1-1. Non-fluorescent gGlu-HMRG was converted to a highly fluorescent HMRG by catalytic reaction with γ -glutamyltranspeptidase.

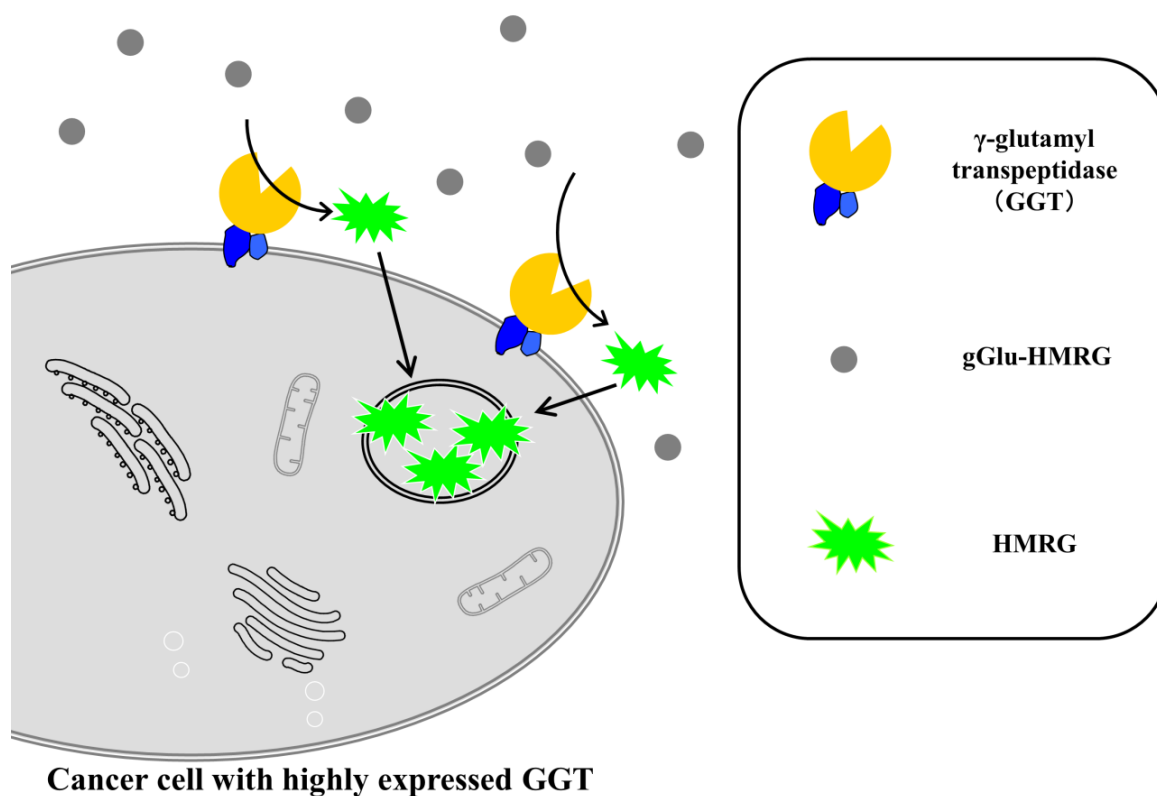


Figure 1-2. The illustration of gGlu-HMRG which was activated by cancer-cell linked γ -glutamyltranspeptidase to produce HMRG which was accumulated to lysosome.

第2節 呼吸器外科領域における肺癌診断の現状と課題

肺癌は日本人の死因の中で悪性腫瘍では1位を占める疾患となった（男性1位、女性2位）[17]。近年予後の改善を目指して積極的な外科切除が行われるようになってきている。そうした状況下、肺癌手術は、80歳を超える高齢者、高度肺気腫をともなった低肺機能の症例、CT検診で発見される2 cm以下の末梢小型肺癌が増加傾向にある。また、手術内容も古典的な肺葉切除から部分切除や区域切除といった縮小手術を選択する症例が増えてきている[18-21]。肺の切除範囲を小さくするこれらの手術では、腫瘍と切離断端との距離が近くなりがちである。現状では肺癌切除後の局所再発率は約6%と報告されているが、今後増加する可能性が危惧されている[22-27]。断端近くの微小癌を肉眼で指摘することは困難であり、またすべての断端を迅速病理診断に提出することは現実的ではない。局所再発を減少させ、予後の改善を目指すために、こうした微小癌を認識できる新たな補助診断の方法が求められている。

第3節 本研究の目的

本研究では、予後不良な肺癌の治療成績改善を目指して、浦野らが創製した酵素反応を利用するペプチダーゼプローブ [7] を原発性肺癌の診断に応用が可能であるか、その有効性について検討を行うこととした。はじめに、ヒト肺癌培養細胞株において、その反応性や反応機序の解明を行った。次に、肺癌モデルマウスやヒト肺癌手術検体に適用し、感度や特異度の解析や、臨床病理学的な特徴などの検討を加えた。その結果より、臨床に応用される具体的な方法、利点や今後の課題を含めて考察を加えた。

第 2 章

ヒト肺癌細胞株における検討

第2章 ヒト肺癌細胞株における検討

原発性肺癌には様々な組織型があり、主なものとしては、日本人に最も多いとされる腺癌（Adenocarcinoma）、次に扁平上皮癌（Squamous cell carcinoma）、他に、大細胞癌（Large cell carcinoma）、小細胞癌（Small cell carcinoma）などがあり、それぞれ形態学的特徴やバイオマーカー、悪性度、予後が異なることが知られている[28]。肺癌の蛍光イメージングを行うにあたり、まずはヒト肺癌細胞株に、ペプチダーゼプローブである gGlu-HMRG を使用して、その反応性を確かめることとした。

第1節 生細胞イメージング

肺癌に GGT が高発現しているという報告はあるが [9-11]、どのような肺癌に発現があるのか詳細な検討はなされていない。そこで、組織型の異なるヒト肺癌細胞株（5 種）にペプチダーゼプローブ（gGlu-HMRG）を適用し、蛍光顕微鏡を用いて癌細胞を観察して、蛍光上昇の有無について検討を行った。

[方法]

肺癌培養細胞株 5 種類、A549（腺癌）、H460（大細胞癌）、H441（高分化腺癌）、H82（小細胞癌）、H226（扁平上皮癌）を使用した。各培養細胞を 8 well chamber slide に目視にておよそ 80% confluent 状態まで 5% CO₂ incubator 内にて培養した。gGlu-HMRG を細胞に滴下して Leica SP-5 共焦点顕微鏡を用いて生細胞蛍光イメージングを行った。Positive control として HMRG を使用して、各細胞株にて gGlu-HMRG 滴下後、蛍光が上昇するか比較をした。

撮影条件：Leica SP-5 共焦点顕微鏡、アルゴンレーザー

励起光 488 nm、蛍光 500-600 nm、gain 650 V

温度：37°C

プローブ：gGlu-HMRG、HMRG とともに 1 μ M (10 mM ストックを PBS(-)にて調整した)

プローブの使用方法：チャンバーの培地を吸引後 gGlu-HMRG 1 μ M, 200 μ l を滴下

撮影時間：プローブ投与前、投与 1, 5, 10, 20, 30 分後

蛍光強度の測定方法：任意に選択した癌細胞の細胞質を 120 μ m² の ROI (Region of interest) で囲い、その面の平均蛍光強度を LAS software を用いて測定した。Figure 2-2 では 10 細胞で測定した蛍光強度の平均値と Standard deviation を表示した。

観察は同一条件下、各細胞株を 3 回ずつ行った。

[結果]

腺癌 2 種 (A549, H441)、大細胞癌 (H460) では、経時的に蛍光シグナルが強くなり、30 分後には強い蛍光シグナルを癌細胞中に認識することができた。一方で、小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) においては、蛍光シグナルを認識することができなかった (Figure 2-1)。また、蛍光の値を数値化した検討では、腺癌 2 種 (A549, H441)、大細胞癌 (H460) では、蛍光強度値が経時的に上昇したが、小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では、蛍光強度値の変化が認められず、蛍光イメージングの結果と一致する結果が得られた (Figure 2-2)。この結果から、組織型により gGlu-HMRG の反

応に差があることが示された。

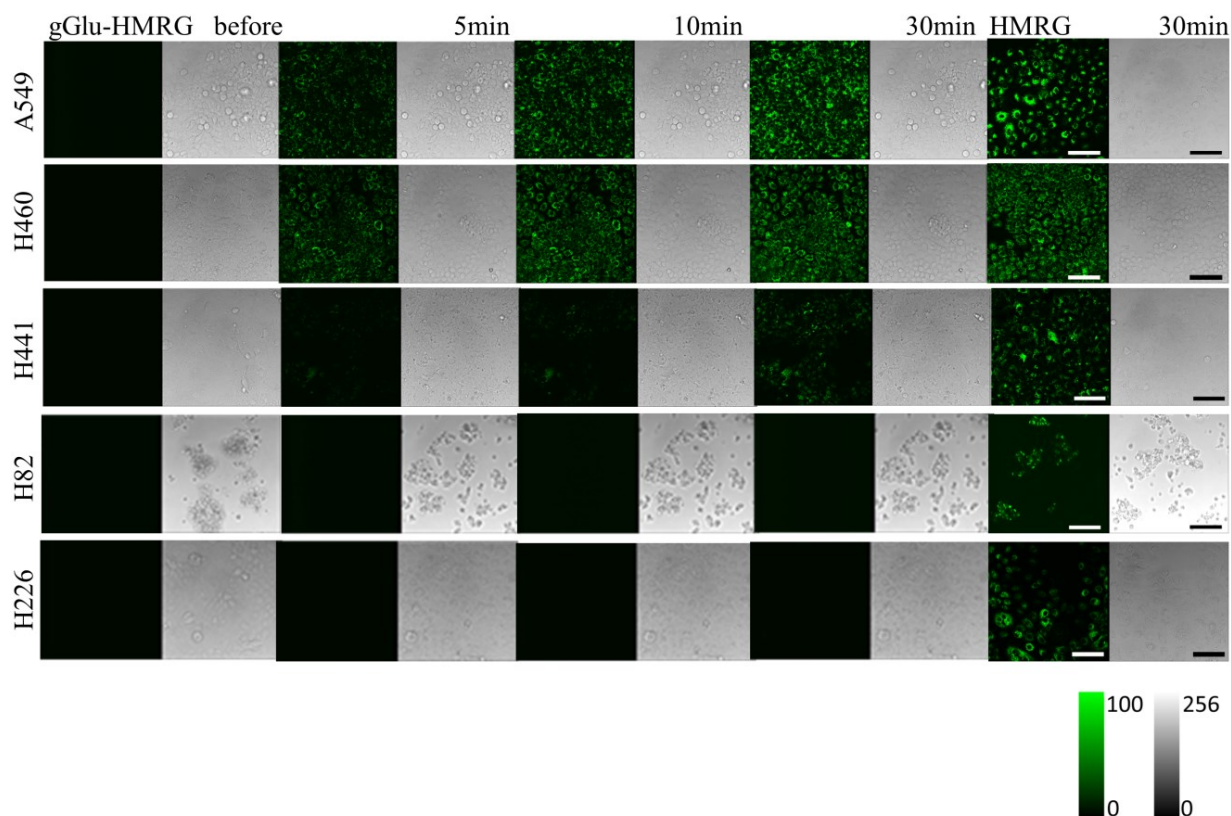


Figure 2-1. Fluorescence confocal imaging of lung cancer cell lines loaded with gGlu-HMRG. Images were captured before and 5, 10, and 30 minutes after probe application. Images of HMRG were captured at 30 minutes as positive control. Scale bar represents 100 μm .

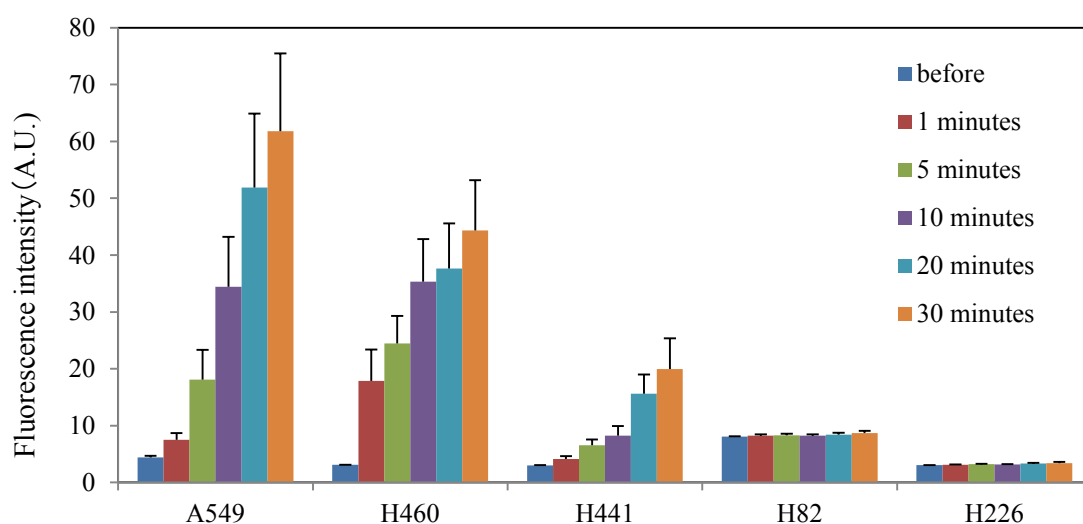


Figure 2-2. Fluorescence intensity of lung cancer cell lines before and 1, 5, 10, 20 and 30 minutes after probe application. Scale bars represents Fluorescence intensity (A.U.) + standard deviation.

第2節 ライセートアッセイ

ヒト肺癌培養株の生細胞イメージングの結果を受け、次に cell lysate の状態と

gGlu-HMRG の反応性を確認した。

[方法]

肺癌培養細胞株 5 種類 (A549, H460, H441, H82, H226) を使用した。各細胞株を 10 cm dish に目視にて 80% confluent 状態まで 5% CO₂ incubator にて培養し、DPBS (2 ml) にて 2 回洗浄後、CellLytic M を 1ml 滴下して細胞を遊離させた。細胞を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移して遠心 (15000g, 15 分, 4°C) をかけて、その上清をライセートとして使用した。ライセートのタンパク濃度は、ブラッドフォード法を用いて計測した。

96 穴のプレート (蛍光用) に各 well にライセートを 90 µl ずつ分注して、プローブ投与前の蛍光強度を SH-8000 (蛍光測定器) にて測定した。その後、gGlu-HMRG 5.5 µM を各 well に 10 µl ずつ添加して、1,5,10,20,30 分後に蛍光強度を測定した。測定は triplicate にて行い、3 well の平均した蛍光強度値を採用した。実験は同一条件で 3 回施行した。

測定条件：SH-8000 プレートリーダー (Corona)、励起光 501 nm、蛍光 524 nm

温度：室温

[結果]

腺癌 2 種 (A549、H441)、大細胞癌 (H460) においては、経時的な蛍光強度の上昇を

認めたが、小細胞癌（H82）、扁平上皮癌（H226）においては、変化を認めなかった（Figure 2-3）。この結果は、生細胞イメージングにおける蛍光強度の変化とほぼ同様な結果となった。すなわち、肺癌細胞株においては、gGlu-HMRG に反応する GGT 活性を持つ株（A549, H460, H441）と持たない株（H82, H226）があることが示された。A549, H460, H441 の蛍光強度の相対値は、生細胞イメージングでの相対値（Figure 2-2）とは異なる。この考察としては、ライセートの蛍光強度は、そのタンパク濃度で規格化しており、細胞間における細胞体積の違いや、HMRG を細胞に取り込む速度の違いを反映していると考えられた。

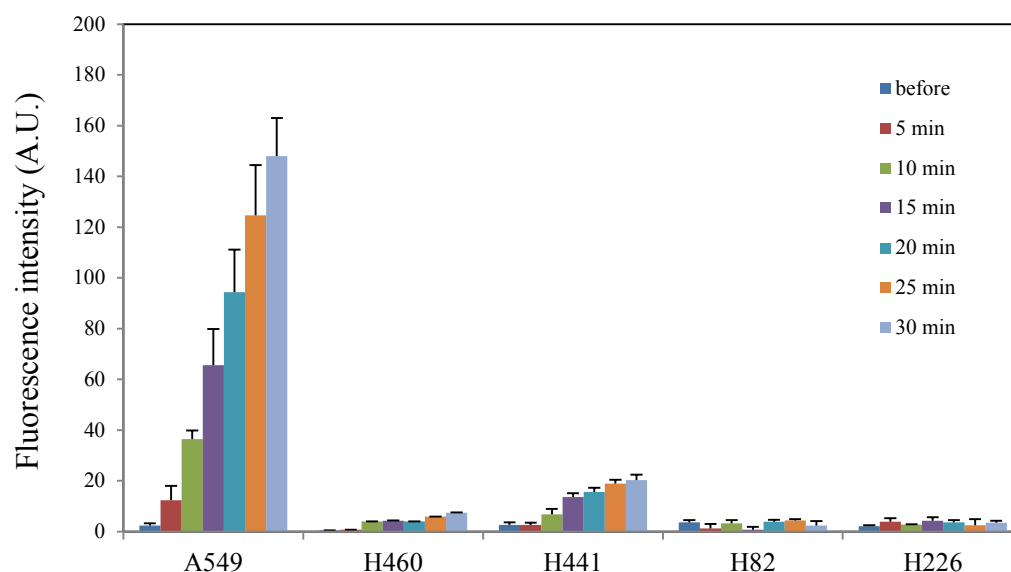


Figure 2-3. Lysate assay for gGlu-HMRG in lung cancer cell lines. Scale bar represents Fluorescence intensity (A.U.) + standard deviation.

第3節 qRT-PCR による GGT1 発現の検討

gGlu-HMRG と反応する酵素が GGT であることを確認するため、GGT の subtype (GGT1, 5, 6, 7) のうち、グルタチオン代謝や抗癌剤耐性など主に癌に関わる [9, 10, 14] とされる GGT1 の mRNA 発現レベルを qRT-PCR にて解析を行った。

[方法]

肺癌培養細胞株 5 種類 (A549, H460, H441, H82, H226) を 10 cm dish に目視にて約 80% confluent 状態まで 5% CO₂ incubator にて培養し、Trizol を 8 ml 各 dish に添加して、細胞を回収した。-80°C にて数日保存後、室温解凍し 1 ml ずつエッペンドルフチューブに分注した。各サンプルにクロロホルム 200 μ l を加え 12000g, 15 分, 4°C にて遠心した。その上清を別のエッペンドルフチューブに移し各サンプルにイソプロパノール 500 μ l を加え、10 分間室温に静置し、12000g, 10 分, 4°C にて遠心した。その後サンプルの上清を除去して各サンプルに 75% エタノール 1 ml を加えボルテックス後、75000g, 5 分, 4°C にて遠心した。エタノールを破棄後、RNA free water 10 μ l を各サンプルに加え、ヒートブロックにて 10 分、60°C で加熱処理し、氷冷後 -80°C のデープフリーザーにて保存した。各肺癌細胞株の RNA 濃度は、ナノドロップにて測定した。cDNA 作成は、cDNA 作成キット (C 6210A TAKARA BIO) を用い、PCR は 96 well Thermal cycler にて 10 分, 30°C \Rightarrow 60 分, 42°C \Rightarrow 5 分, 95°C の条件で行った。qRT-PCR は GGT1, hHPRT1 (各 50 μ M) を primer として使用した。(配列は下記に記載)

96 穴プレートに cDNA 及び LightCycler 480 SYBER Green I Master を加え、各サンプルは triplicate にて測定し、Light Cycler 480 System II を用いて計測を行った。GGT1 の mRNA 発現量は hHPRT1、GAPDH を内部標準とした相対値として表した。

統計：T 検定にて $p < 0.05$ を有意差ありとした。

Primer 配列

GGT1

forward:5'-GTGTTCTGCCGGGATAGAAA-3'

reverse:5'-CAGGTCCTCAGCTGTCACAA-3'

hHPRT1

forward:5'-GTTCTTTGCTGACCTGCTGGAT-3'

reverse:5'-CTTTTATGTCCCCCGTTGACTG-3'

[結果]

qRT-PCR の結果から、生細胞イメージングやライセートアッセイにて gGlu-HMRG を使用して蛍光の上昇が確認できた腺癌 2 種 (A549, H441)、大細胞癌 (H460) においては、GGT1 の相対的遺伝子発現の値が有意に高く、反応が確認できなかった小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では、その発現が有意に低いことが確認された (Figure 2-4) ($p < 0.05 \sim 0.01$)。

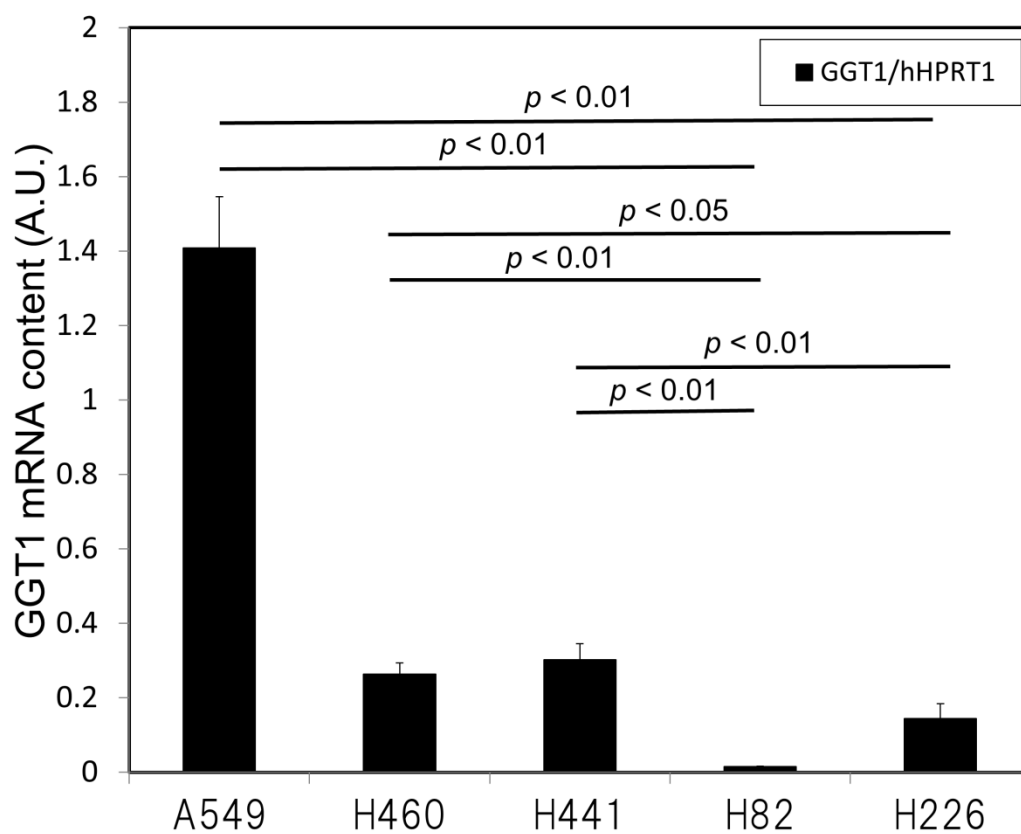


Figure 2-4. Relative GGT1 expression level was measured by qRT-PCR in lung cancer cell lines. Bar represents relative GGT1 mRNA contents (A.U.) + standard deviation.

第4節 siRNA 導入株における検討

次に、gGlu-HMRG と反応する酵素が GGT1 である証明をするため、GGT1 を阻害するように設計された siRNA と negative control としての siRNA を肺癌細胞株に導入して、生細胞蛍光イメージングと qRT-PCR にて GGT1 の発現を検討することとした。

[方法]

siRNA は GGT1 を阻害するように設計した siRNA1、siRNA2 の 2 種と何も阻害作用のない control siRNA（各 50 nM、配列は下記に記載）を使用した。

生細胞蛍光イメージング (Figure 2-6)

肺癌培養細胞株 5 種類 (A549, H460, H441, H82, H226) を 8 well chamber slide に移し 5% CO₂ incubator にて培養した。siRNA の導入直前に抗生剤 (Penicillin-Streptomycin 1%) を含まない培地 200 μ l に交換をした。OPTI-MEM 200 μ l と Lipofectamine RNAiMAX transfection Reagent 1 μ l の混合液 (A) と OPTI-MEM 200 μ l に各 siRNA (siRNA1, siRNA2, control siRNA) 0.24 μ l の混合液 (B) を作成した。(A) と (B) を混和して 5 分間静置した。これを 4 well に各 100 μ l ずつ添加して、siRNA 最終濃度を 10 nM に統一した。siRNA 導入後 48 時間培養してから生細胞蛍光イメージングに使用した。撮影は Leica SP-5 共焦点顕微鏡を用いて行った。gGlu-HMRG 1 μ M, 200 μ l 投与前、投与後 30 分の蛍光画像を撮影した。撮影は同一条件下 3 回ずつ施行した。

撮影条件：アルゴンレーザー、励起光 488 nm、蛍光 500-600 nm、gain 600 V

温度 : 37°C

プローブ : gGlu-HMRG 1 μ M (10 mM ストックを PBS(-)にて調整した)

プローブの使用方法 : チャンバーの培地を吸引後 gGlu-HMRG 1 μ M, 200 μ l を滴下

撮影時間: プローブ投与前、投与後 30 分

qRT-PCR (Figure 2-7)

肺癌培養細胞株 5 種類 (A549, H460, H441, H82, H226) を 10cm dish に 5% CO₂ incubator にて培養して、siRNA の導入直前に抗生剤 (Penicillin-Streptomycin 1%) を含まない培地に交換をした。OPTI-MEM 170 μ l と Lipofectamine RNAiMAX transfection Reagent 10 μ l の混合液 (A) と OPTI-MEM 170 μ l に各 siRNA (siRNA1, siRNA2, control siRNA) 2 μ l の混合液 (B) を作成した。(A) と (B) を混和して 5 分間静置した。これを肺癌細胞株を培養した 10cm dish に混和して、siRNA 最終濃度を 10 nM に統一した。siRNA 導入後 48 時間培養してから、RNA の抽出と qRT-PCR を第 2 章第 3 節と同様のプロトコールにて行い、内部標準は hHPRT1 として相対値として表した。統計解析は T 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

siRNA 配列 :

GGT1 siRNA1 sense: 5'-rCrArArCrArGrCrArCrArCrArCrGrArArArArGrC-3'

GGT1 siRNA1 antisense : 5'-UUUUrCrGUrGUrGrGUrGrGUrGUUrGUrA-3'

GGT1 siRNA2 sense : 5'-rCrCrArArGrGrArArCrCUrGrACAACCATG-3'

GGT1 siRNA2 antisense : 5'-TGGTTGUrCrArGrGUUrCrCUUrGrGrArg-3'

control siRNA sense : 5'-rGUrArCrCrGrCrArCrGUrCrAUUrCrGUrAUrC-3'

control siRNA antisense : 5'-UrArCrGrArAUrGrArCrGUrGrCrGrGUrArCrGU-3'

[結果]

siRNA を導入した肺癌細胞株の蛍光画像について、GGT1 を抑制する 2 種の siRNA1、siRNA2 をそれぞれ導入した腺癌 2 種 (A549, H441)、大細胞癌 (H460) においては、negative control siRNA を導入した control 群と比較して、その蛍光強度がそれぞれ減少していることが確認された。一方で、小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) においては、いずれの群においても gGlu-HMRG を滴下しても蛍光を認識することができなかった (Figure 2-6)。

次に、GGT1 の mRNA 発現量 (相対値) を qRT-PCR にて測定した。GGT1 の相対的な発現量が多い腺癌 2 種 (A549, H441)、大細胞癌 (H460) において、siRNA1 と siRNA2 導入株は control 群と比較して有意に GGT1 発現量が減少していることが確認された ($p < 0.001$)。一方、GGT1 の相対的発現量が少ない小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では、一部を除き siRNA1 と siRNA2 導入株と control 群の間で GGT1 の発現量に差を認めないことを確認した ($p < 0.05$, $p = 0.20-0.99$) (Figure 2-7)。以上より、gGlu-HMRG と癌細胞の酵素反応においては、 γ -glutamyltranspeptidase (GGT) の subtype の 1 つである GGT1 が関与していることが示された。

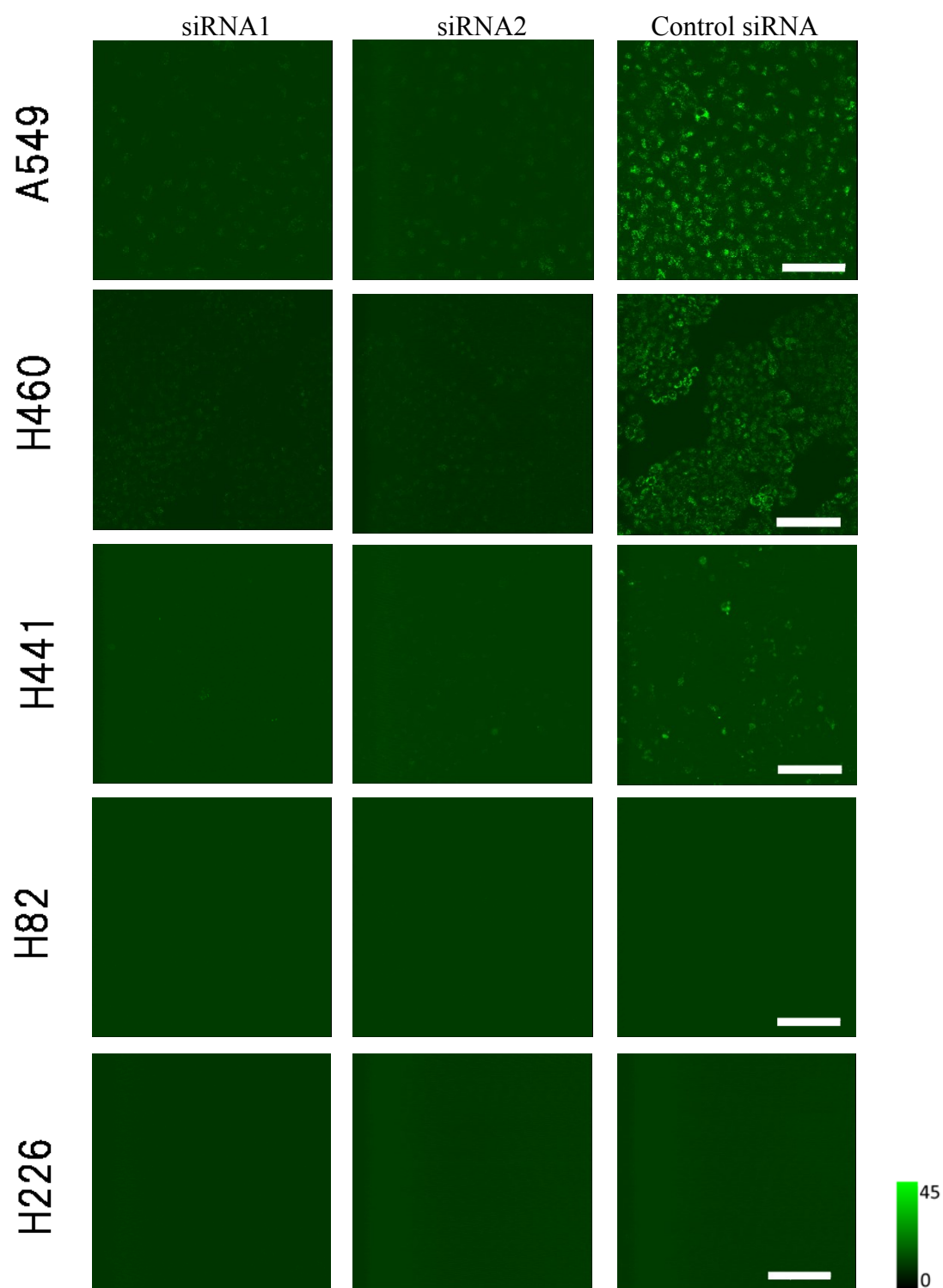


Figure 2-6. Fluorescence confocal imaging of lung cancer cell lines (A549, H460, H441, H82 and H226) which were transfected with siRNA 1, siRNA2, and control siRNA, followed by incubation with 1 μ M gGlu-HMRG for 30 minutes. Scale bar represents 100 μ m.

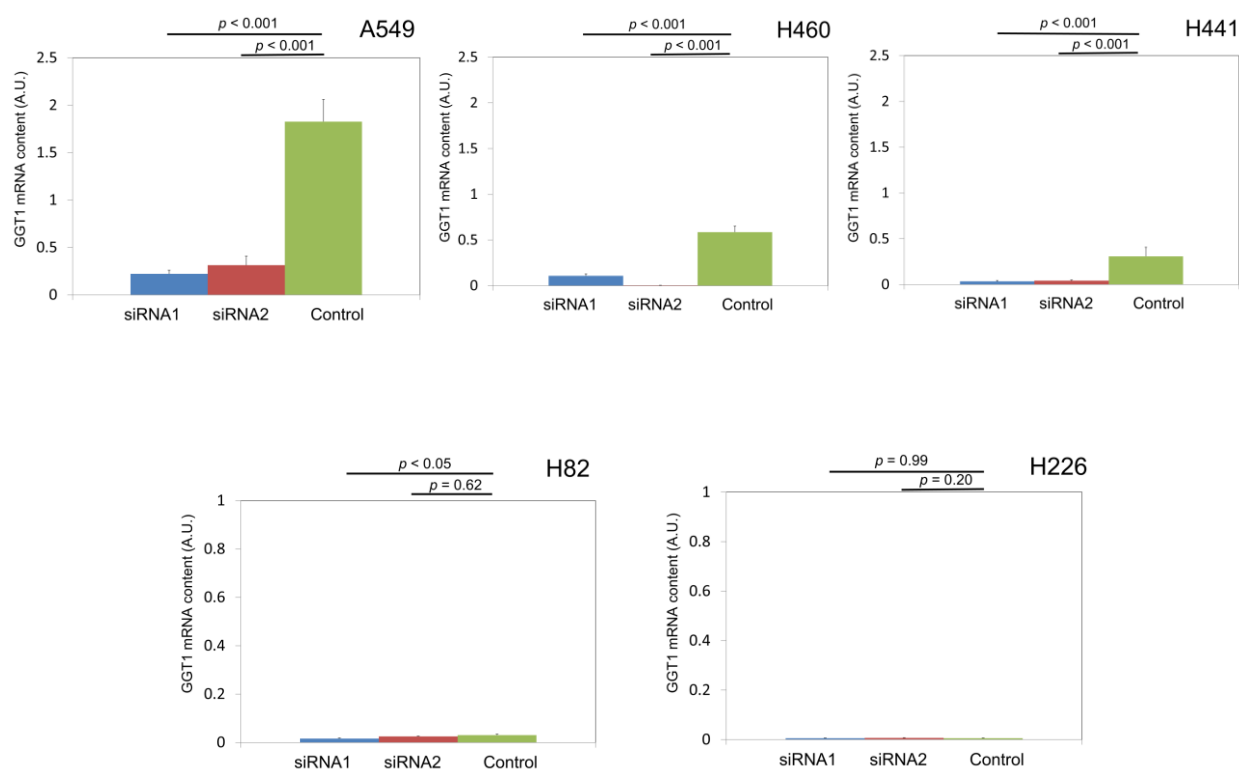


Figure 2-7. GGT1 mRNA content of lung cancer cell lines transfected with siRNA1, siRNA2 and control siRNA measured by qRT-PCR. hHPRT1 was used as internal standard. Bar represents relative GGT1 mRNA contents (A.U.) + standard deviation.

第 3 章

肺癌モデルマウスにおける検討

第3章 肺癌モデルマウスにおける検討

腺癌細胞株(A549)を用いて肺癌モデルマウスを作成し、gGlu-HMRG が *in vivo* の状態で肺癌イメージングに使用可能であるか検討を行った。

第1節 肺癌モデルマウスの作成 (A549 orthotopic xenograft model) [29, 30]

マウスは BALB/cAjlcr-nu/nu (7 週/メス)を日本クレアから購入した。

＜モデルマウス作成方法＞ Figure 3-1.参照

0)A549 を培養した 10 cm dish からトリプシンを用いて遊離し、PBS を用いて 4×10^7 cells/ml 細胞懸濁液を調整した。さらに、10% Matrigel 溶液と 1:1 に混和し、 2×10^7 cells/ml 細胞懸濁液 (5% Matrigel を含む) を調整した。

1)ケタミン、キシラジンをそれぞれ 2 mg/mouse, 0.2 mg/mouse ずつマウスの腹腔内に投与し、麻酔をかけた。

2)麻酔のかかったことを確認し、マウス左胸部の皮膚を約 2 cm ほど切開した。

3)はさみで皮下を剥離し、肋間の胸膜から左肺が透見できることを確認した。

4)左肺に 30 Gauge の針を用いて細胞懸濁液を 25 μ l 注入した (5×10^5 cells/mouse)。

皮膚を 4-0 ナイロンにて縫合閉鎖して、麻酔が醒めるまで経過観察した。その後、飼育ケージに戻し、1-2 週間飼育後、実験に使用した。



Figure 3-1. A549 orthotopic xenograft model was made by injection of A549 cells with matrigel into the left lung of nude mouse.

第2節 肺癌モデルマウスの蛍光画像、及び病理組織学的検討

前節にて作成したモデルマウスを用いて、*in vivo* imaging を行った。

[方法]

前節のプロトコールにて作成した肺癌モデルマウスのうち2週間飼育したものを使用した。CO₂にて安楽死させたのちに、左胸腔を開放して、gGlu-HMRG 投与前と投与後15分の白色像と蛍光画像を実体顕微鏡にて撮影した。蛍光で指摘できた病変部は、10%ホルマリンにて保存後パラフィン切片を作成して、Hematoxylin Eosin stain にて病理組織学的検討を行った。マウスは計14匹使用した。

撮影条件：実体顕微鏡 Leica M 165FC

励起光 460-500 nm band-pass, 蛍光 510 nm long-pass

プローブ：gGlu-HMRG 10 μ M (10 mM ストックを PBS(-)にて調整した)

プローブの使用方法：マウス左胸腔に gGlu-HMRG 10 μ M, 200 μ l を滴下

温度：室温

[結果]

白色像 (Figure 3-2A) では、肺腫瘍以外の微小病変を指摘することは困難であった。

一方、蛍光画像では gGlu-HMRG 投与後約15分後には、モデルマウスの胸腔内の左肺腫瘍を始め、縦隔・肺門リンパ節転移、胸腔内播種病変を正常部位と比較して強い蛍光として認識することができた (Figure 3-2 B, C)。また、蛍光イメージングで認識できた肺腫瘍、肺門・縦隔リンパ節、胸腔内結節を採取して、病理組織学的に検討を

行くと、該当部位から癌組織を確認することができた (Figure 3-2 D, E, F)。

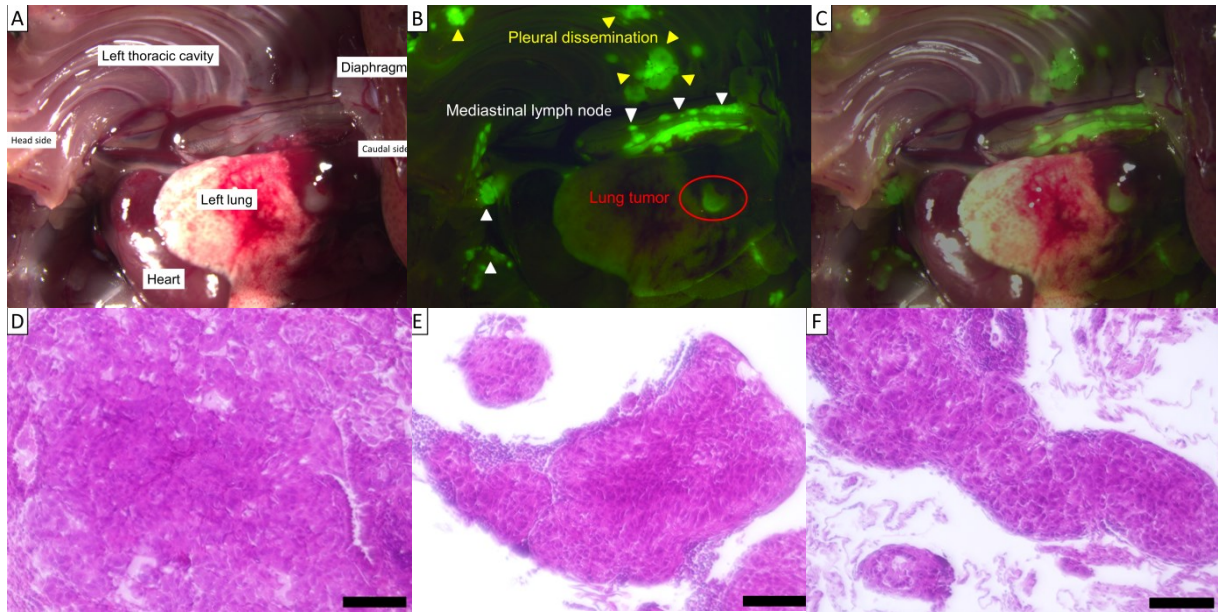


Figure 3-2. Fluorescence and merge images showed lung tumor, hilar and mediastinal lymph node metastasis and pleural dissemination in orthotopic A549 xenograft model in nude mouse 2 weeks breeding, which was captured by fluorescence microscope. A:White light image B:Fluorescence image C:Merge image of white light and fluorescence D:Hematoxylin and eosin staining of lung tumor E: Hematoxylin and eosin staining of mediastinal lymph node F:Hematoxylin and eosin staining of pulmonary dissemination. Scale bar represents 100 μm .

[小括 1]

- ・ gGlu-HMRG を投与した肺癌細胞株の検討では、組織型でその反応が異なり、腺癌（A549, H441）、大細胞癌（H460）では癌細胞に高い蛍光強度を認識することができたが、小細胞癌（H82）、扁平上皮癌（H226）では蛍光を認識することができなかった。
- ・ 肺癌細胞株に siRNA を導入し、生細胞イメージングと qRT-PCR の検討を行い、gGlu-HMRG に反応する酵素が、GGT の subtype の 1 つである GGT1であることを示した。
- ・ 肺癌モデルマウスに対して、gGlu-HMRG を局所滴下することで、15 分程度で表在の癌組織（肺腫瘍、肺門・縦隔リンパ節転移、胸膜播種）の局在を、1 ミリ単位の大きさでも、強い蛍光性から正常部位と区別することができ、また病理組織学的にも癌組織を認めた。

第4章

ヒト肺癌手術検体を用いた検討

第4章 ヒト肺癌手術検体を用いた検討

これまでのヒト肺癌培養株を用いた検討では、腺癌や大細胞癌に gGlu-HMRG の有効性が確認された。臨床への応用を考えるため、ヒト肺癌手術検体に gGlu-HMRG を適用して、癌組織で蛍光が上昇するか確認することとした。検体採取の際には事前に同意書を取得して行った。

(倫理申請 3900:肺および縦隔腫瘍における癌特異的蛍光プローブの有用性及び新規プローブ開発に関する研究)

第1節 肺癌組織及び正常肺における蛍光画像の取得

摘出した肺癌手術検体に gGlu-HMRG を投与して、蛍光イメージャーにて、蛍光画像を撮影して、有効性を検討した。全 73 症例の概要を Table 4-1.に示した[28, 31]

Characteritics		
Age,yr, mean (range)		72.1 (34-90)
Gender	Male	46 (63.0%)
	Female	27 (37.0%)
Tumor size, mm, mean (range)		34.7 (10-80)
Brinkman index, mean (range)		951 (0-3200)
Procedure	Pneumonectomy	1(1.4%)
	Lobectomy	62(84.9%)
	Partial resection	10(13.7%)
Histology	Adenocarcinoma	48(65.8%)
	Squamous cell carcinoma	15(20.5%)
	Others	10(13.7%)
Pathological stage	I	45(61.6%)
	II	16(21.9%)
	III	11(15.1%)
	IV	1(1.4%)

Table 4-1. Characteristics of 73 lung cancer patients.

[方法]

手術にて摘出された肺を病理部へ運搬し、担当病理医が肺癌部位と正常肺の一部を研究用として切り分けて、これを医学部 3 号館別棟 2 階に運搬してイメージングの実験を行った。まず蛍光イメージャー (Maestro[®]) にて gGlu-HMRG 投与前の蛍光画像、デジタルカメラで白色像を撮影し、その後 gGlu-HMRG を肺癌と正常肺にそれぞれ組織が浸るまで滴下して、1, 3, 5, 10, 20, 30 分後の蛍光画像を撮影した。また撮影後の肺癌、正常肺は 10%ホルマリンに保存して、Hematoxylin and Eosin stain にて病理組織学的に検討を行った。

プローブ : gGlu-HMRG 50 μ M (10 mM ストックを PBS(-)にて調整した)

投与方法 : 肺腫瘍、正常肺に gGlu-HMRG を 100 μ l 程度ずつ検体が浸るまで滴下した

撮影条件 : Maestro[®] 励起光 465 nm broad-pass、蛍光 515 nm long-pass、露光 15-50 ms

温度 : 室温

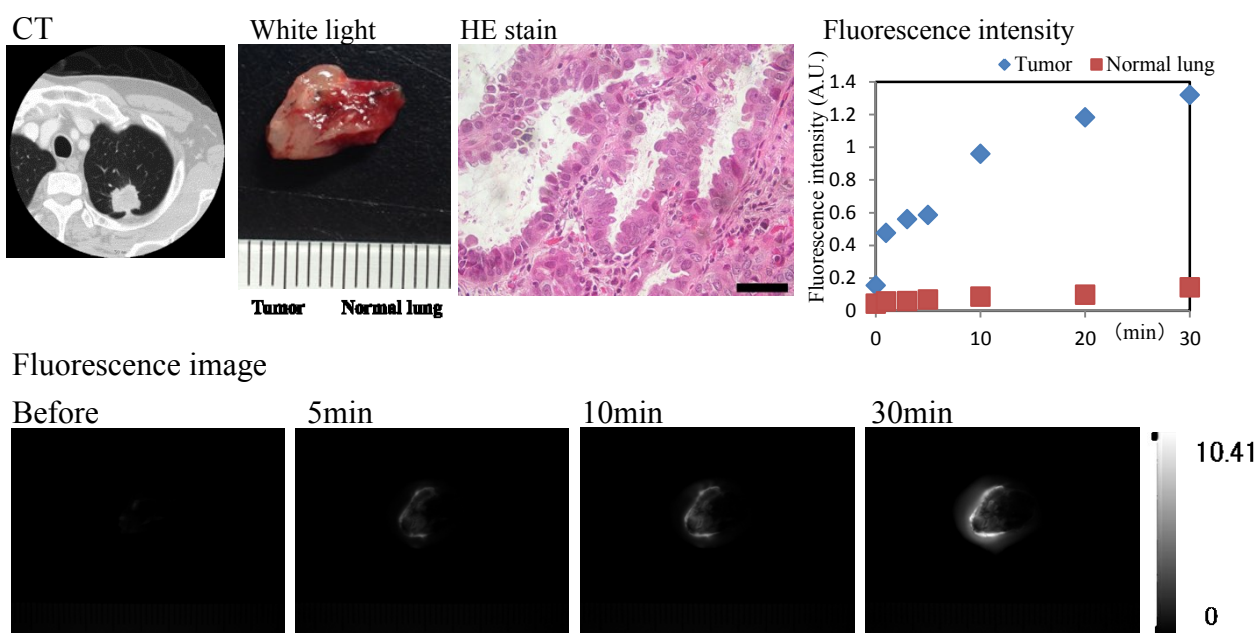
実験回数 : 各検体 1 回のみ

[結果]

以下に肺癌手術検体のイメージング結果を3症例提示した (Case1, 2, 3)。

Case 1 では、腫瘍と正常肺が連なっているが、蛍光画像から腫瘍部で蛍光が徐々に上昇しており、また蛍光強度グラフよりそのことが確認された。また、病理組織学的には腺癌 (papillary type) であった。

Case 1. 76y/Male (260305) ex-smoker

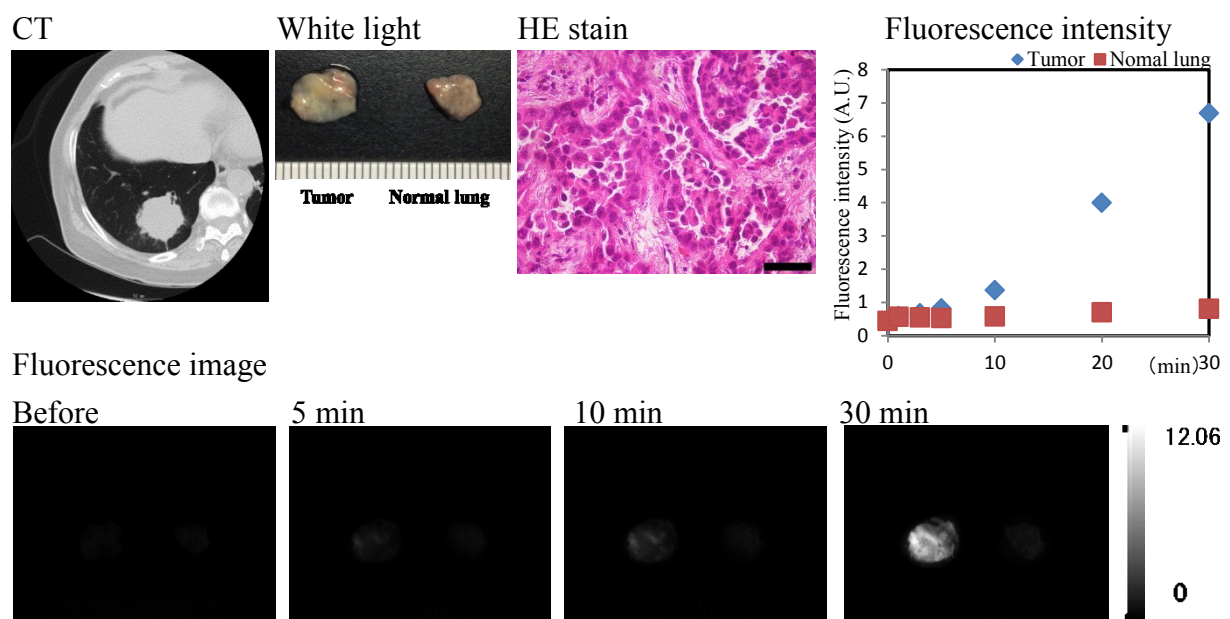


Diagnosis: Adenocarcinoma, 32×30×25 mm, pT2aN2M0-III A

Figure 4-1. Preoperative CT, White light image, HE stain, fluorescence image and intensity in 76-year old male patient. Scale bar represents 50 μ m.

Case 2 では、腫瘍と肺を分けて imaging しているが、腫瘍側で徐々に蛍光が強くなり、30 分後では正常肺と比べ、腫瘍側が明るいことが蛍光画像から認識され、蛍光強度のグラフからも同様のことを確認することができた。病理組織学的には腺癌（papillary type）であった。

Case 2. 80y/female (250712) Never smoker



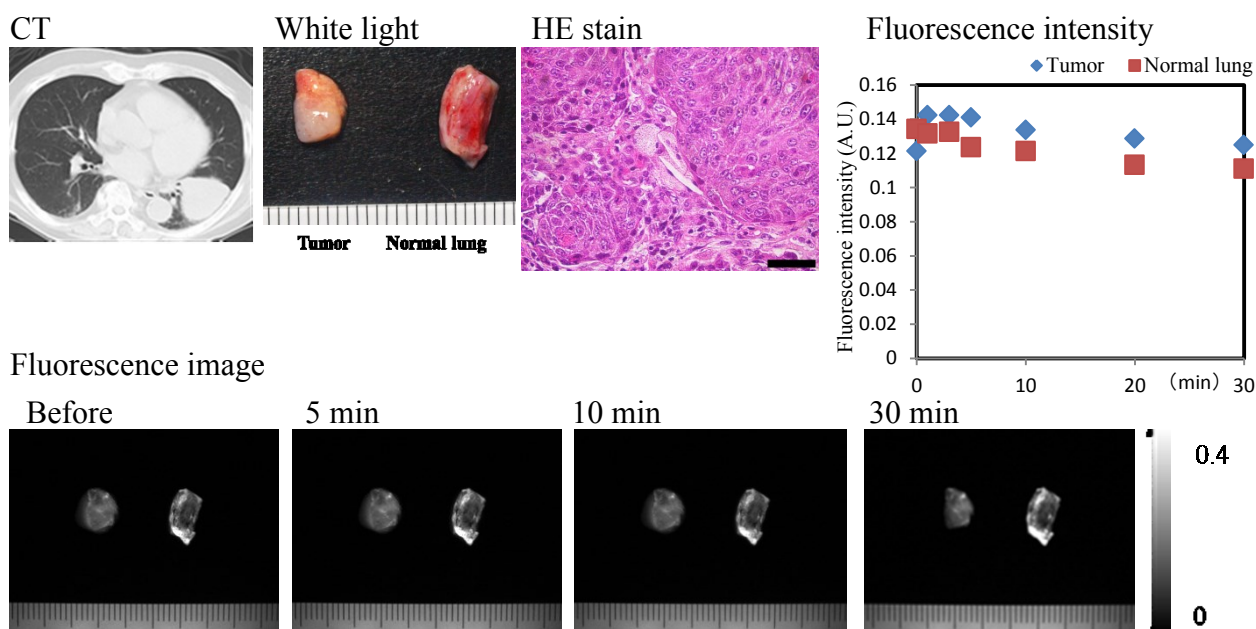
Diagnosis: Adenocarcinoma, 32×30×25 mm, pT2aN2M0-III A

Figure 4-2. Preoperative CT, White light image, HE stain, fluorescence image and intensity in 80-year old female patient. Scale bar represents 50 μ m.

Case 3 では、蛍光画像上、腫瘍と肺ともに経時的に蛍光の変化を認めず、また蛍光強度のグラフにおいても変化の乏しいことが確認された。病理組織学的には扁平上皮癌であった。

Case 1-3 の結果より、摘出標本における原発性肺癌に対する gGlu-HMRG の反応性は、肺癌培養細胞株と同様に、肺癌の組織型により異なることが示された。

Case 3. 70y/male (250111) ex-smoker



(参考) Case 2 と同一の条件で表示



Diagnosis: Squamous cell carcinoma, 58×50×50 mm, pT2bN0M0- II A

Figure 4-3. Preoperative CT, White light image, HE stain, fluorescence image and intensity in 70-year old male patient. Scale bar represents 50 μ m.

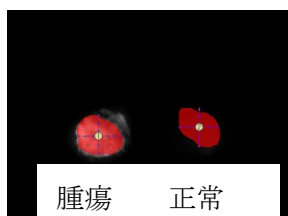
第2節 蛍光画像の解析及び臨床病理学的検討

前節のようにして全 73 症例の取得した蛍光画像を感度・特異度の観点から解析し、臨床病理学的に検討を行った。

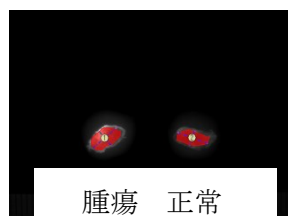
[方法]

全 73 症例の蛍光画像のうち、腫瘍部と正常肺の全体を ROI (Region of interest) で囲い、その面積全体における蛍光強度を Maestro software にて測定した。測定は 3 回行い、平均値を採用した。ROI を囲う例を以下に示した。各症例の腫瘍部と正常肺において、30 分後の蛍光画像の蛍光強度とプローブ投与前の蛍光強度の差を蛍光上昇値として定義した。次に、JMP 11.0 pro の ROC curve (Receiver Operating Characteristics curve) を用いて最適な cutoff 値、AUC (Area under curve) を定め、感度、特異度を解析した。

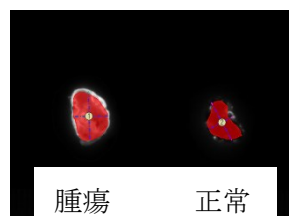
ROI の例



250712



250726



250311

[結果]

gGlu-HMRG の原発性肺癌に対する診断率は、Cutoff 値 0.2283、AUC 0.623 において感度 43.8% (32/73)、特異度 84.9% (62/73) であった (Figure 4-4)。また、腺癌 (48 症例) に限定すると、Cutoff 値 0.2404、AUC 0.675 において感度 58.3% (28/48)、特異度 79.2% (38/48) と算出された (Figure 4-5)。その他、陽性的中率、陰性的中率、正確度は 60-75% の範囲に存在することも確認できた (Table 4-2)。

gGlu-HMRG にてイメージング可能な肺癌は全体の約半数であるのは、肺癌組織の GGT の発現も半数程度であることを反映していると考えられた。一方で、正常肺においても少数ながら蛍光が上昇する症例が存在していた。その原因としては、Case 4 のように、GGT 活性を持つとされるマクロファージの浸潤が広範にあるために gGlu-HMRG が反応してしまう例が 3 例あり、その影響ではないかと推測された (Figure 4-6)。

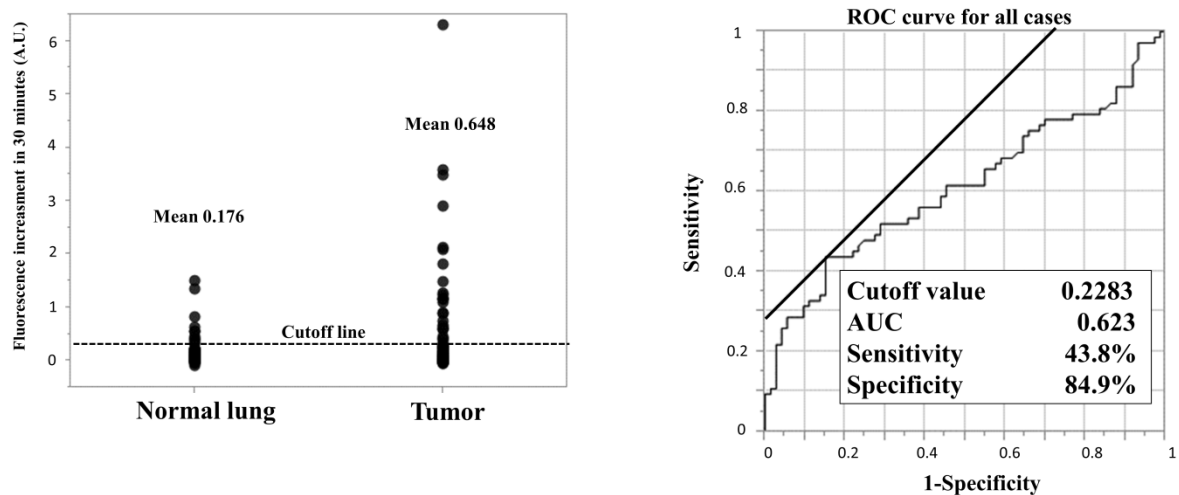


Figure 4-4. Fluorescence increase in all cases in 30 minutes (left). ROC curve for all cases (right). ROC and AUC represent Receiver Operating Characteristics and area under curve respectively.

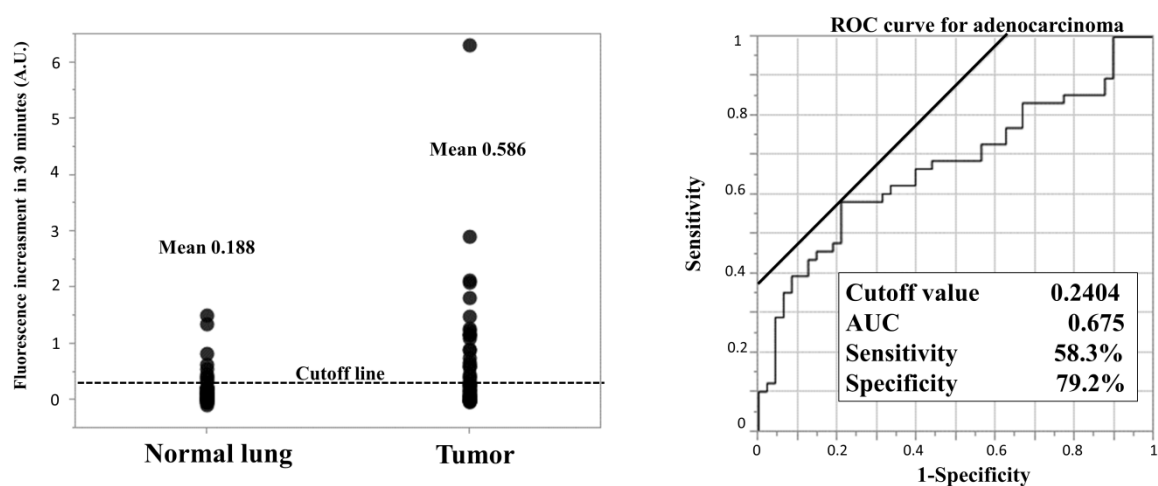


Figure 4-5. Fluorescence intensity in adenocarcinomas in 30 minutes (left). ROC curve for adenocarcinomas (right). ROC and AUC represent Receiver Operating Characteristics and Area under curve respectively.

	All cases	Adenocarcinoma
Cutoff value	0.22833	0.2404
AUC(Area under curve)	0.62306	0.67535
Sensitivity	43.8%(32/73)	58.3%(28/48)
Specificity	84.9%(62/73)	79.2%(38/48)
Positive predictive value	74.4%(32/43)	73.7%(28/38)
Negative predictive value	60.2%(62/103)	65.5%(38/58)
Accuracy	64.4%(94/146)	68.8%(66/96)

Table 4-2. Results of ROC curve analysis for all cases and adenocarcinoma in 30 minutes.

Case 4. 66y/male (250605)

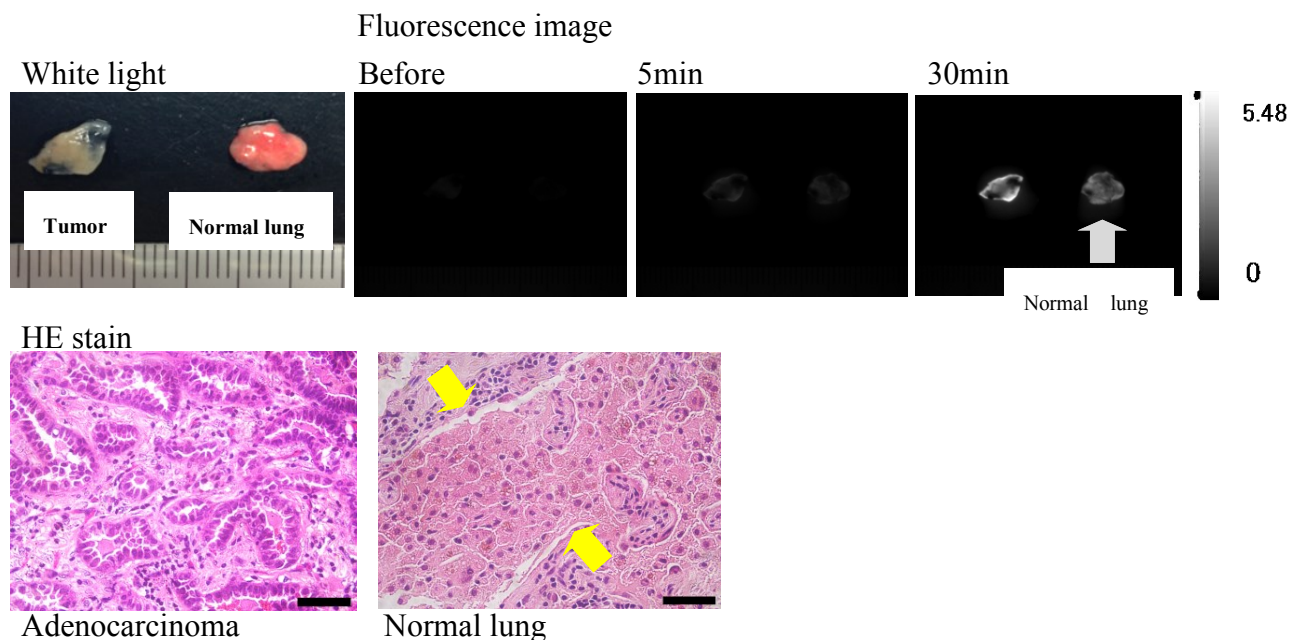


Figure 4-6. White light, Fluorescence image and HE stain in 66-year male lung cancer patient (Adenocarcinoma pT1bN0M0- I A). Histiocytic infiltrate was included in normal lung (yellow arrow), which was visualized by gGlu-HMRG in fluorescence image (gray arrow). Scale bar represents 50 μm.

次に 30 分後の画像解析の結果（前述）以外にも、より早い時間（5,10,20 分後）において感度・特異度がどのように変化するか解析し、至適観察時間について検討を行った。

〔方法〕 前述の 30 分後の蛍光上昇値を測定した方法と同様にして、5, 10, 20 分後の蛍光上昇値を計算して、JMP Pro 11.0 の ROC curve を用いて解析した。

〔結果〕

Table 4-3, Figure 4-7 より感度は経時的に上昇傾向を認めたが、特異度はむしろ少し減少傾向にあり、30 分で AUC が最も高い結果となった。

	5minutes	10minutes	20minutes	30minutes
Cutoff value	0.115667	0.18	0.19367	0.22833
AUC	0.56774	0.57553	0.58444	0.62306
Sensitivity	34.2%(25/73)	31.5%(23/73)	38.4%(28/73)	43.8%(32/73)
Specificity	90.4%(66/73)	93.2%(68/73)	84.9%(62/73)	84.9%(62/73)
Positive predictive value	78.1%(25/32)	82.1%(23/28)	71.8%(28/39)	74.4%(32/43)
Negative predictive value	57.9%(66/114)	57.6%(68/118)	57.9%(62/107)	60.2%(62/103)
Accuracy	62.3%(91/146)	62.3%(91/146)	61.6%(90/146)	64.4%(94/146)

Table 4-3. Results of ROC curve analysis at 5, 10, 20 and 30 minutes.

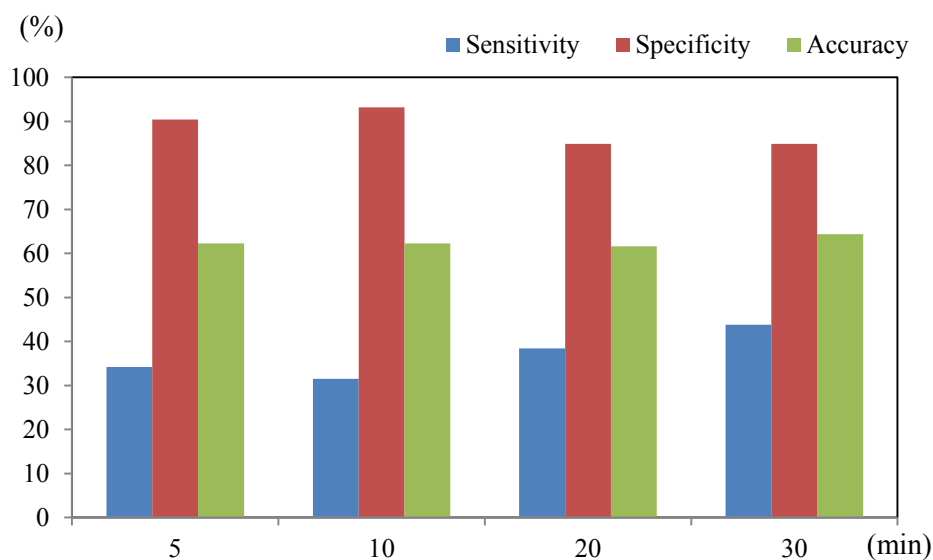


Figure 4-7. Sensitivity, Specificity and Accuracy of gGlu-HMRG for primary lung cancer at 5, 10, 20 and 30 minutes.

次に、臨床病理学的観点から gGlu-HMRG がどのような症例において反応しているか検討を行った。

〔方法〕 前述の肺癌 73 症例に gGlu-HMRG を滴下して 30 分間の蛍光画像の蛍光上昇値を用いた。JMP Pro 11.0 の ROC curve から算出した cutoff 値 (0.2283) を採用し、cutoff 値より高く蛍光が上昇した症例を反応ありとし、それより低いものを反応なしとして全 73 症例について判定を行った。臨床病理学的な情報は、電子カルテ上から参照した。統計解析には χ^2 二乗検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

〔結果〕 臨床病理学には女性、非喫煙者、腺癌において有意に gGlu-HMRG と反応する症例が多いことが明らかとなった ($p < 0.05 \sim 0.001$)。しかし、臨床病期、病理病期、リンパ節転移、リンパ管浸潤、脈管浸潤、CEA、EGFR mutation、腺癌の subtype 別に分けた解析では、特に有意差は認められなかった (Figure 4-8)。女性、非喫煙者、腺癌の GGT 発現と肺癌の発癌機構に関連性が推測された。



Figure 4-8. Clinicopathological features of response for gGlu-HMRG.

Adeno ca=Adenocarcinoma, CEA=Carcinoembryonic antigen, EGFR=Epidermal Growth Factor Receptor, BAC=Bronchoalveolar carcinoma, Por=Poor differentiated

Figure 4-8.の結果を受け、女性かつ非喫煙腺かつ腺癌である症例（19 例）に絞って検討を行ったところ、感度 79.0%（15/19）、特異度 73.7%（14/19）と算出され、このような症例群に対しては、特に有効であることが確かめられた。

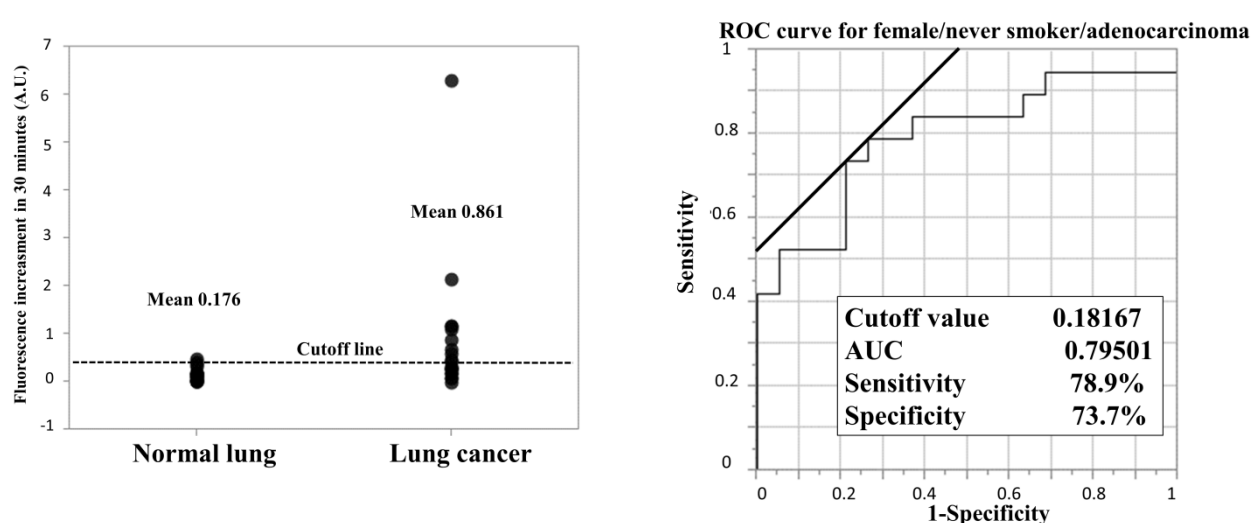


Figure 4-9. Fluorescence intensity in female/never smoker/adenocarcinoma in 30 minutes (left). ROC curve for female/never smoker/adenocarcinoma (right). ROC and AUC represent Receiver Operating Characteristics and Area under curve respectively.

	female/never smoker/adenocarcinoma
Cutoff value	0.18167
AUC(Area under curve)	0.79501
Sensitivity	78.9%(15/19)
Specificity	73.7%(14/19)
Positive predictive value	78.9%(15/19)
Negative predictive value	73.7%(14/19)
Accuracy	76.3%(29/38)

Table 4-4. Results of ROC curve analysis for female/never smoker/adenocarcinoma in 30 minutes.

第3節 免疫組織染色による検討

蛍光イメージングを行った肺癌 73 症例について、GGT1 に対する免疫染色 (DAB 法) を行い、GGT1 の発現について免疫組織学的に検証した。

[方法]

前章にて 10%ホルマリンに保存した腫瘍の検体を使用した。

①パラフィン包埋された検体を厚さ 4 μm に切り出し、37°Cで一晩乾燥させた。各検体 2 枚ずつ切り出し、1 枚は免疫染色に、1 枚は Control として 1 次抗体を使用しないものとした。

②脱パラフィン処理を室温のキシレン槽 (5 分×4 回)、無水エタノール槽 (100%、90%、80%各 5 分) にそれぞれ漬けた後に流水で 30 秒間洗浄した。

③内因性ペルオキシダーゼの不活化には 3%過酸化水素水入りエタノールで 20 分室温で反応させ、その後流水で洗浄、乾燥させた。

④1 次抗体は GGT1 に対する抗体 (Abnova H00002678) を用いて、1:370 の濃度で 5% BSA にて希釈して、各検体に 200 μl ずつ滴下して、4°Cにて一晩反応させた。

Control の標本には、1 次抗体を含まない 5% BSA 200 μl を滴下した。

⑤2 次抗体とアビジン-ビオチン反応には VECTASTAIN Elite ABC kit #PK-4002 を用いた。各検体に 2 次抗体を 3 滴滴下して 1 時間室温で静置、洗浄した。その後各検体にアビジン-ビオチン反応液を 3 滴滴下して 20 分室温にて反応させ、洗浄した。

⑥DAB 染色は ImmPACT DAB #SK-4105 を使用し、各検体 200 μl ずつ滴下して約 1

分間反応させ、染色具合を確認後、流水で洗浄した。

⑦核染色をヘマトキシリンにて室温で 30 秒～1 分間染色した。

⑧アルコール脱水は、室温にて 70%,80%,90%,100%のアルコールに 20 秒ずつ順につ
け、その後キシレン槽に 20 秒つけた。最後にカバーガラスをのせて封入して、1 時間
ほど乾燥させ、観察した。

GGT1 免疫染色の判定は、Control と比較し陽性癌細胞が確認できたものを陽性とした。

[統計]

免疫染色の結果と蛍光イメージングの結果について、両者の一致率については χ^2 二乗
検定を行った。

[結果]

免疫染色の結果を Figure 4-10 に示した。局在についての検討では、GGT1 は、腺癌では細胞膜に高発現し、その他の非腺癌の組織型では、細胞質に存在する傾向を認めた。

Table 4-5 には蛍光イメージングと免疫染色の結果について両者の陽性数、陰性数を示した。全体の約 7 割に両者の一致が確認され、 χ^2 二乗検定において有意に相関する結果であった ($p < 0.005$)。その中で、偽陰性症例（免疫染色が陽性であったが、蛍光画像では反応なしと判定された 12 例）が多い原因としては、蛍光が微弱であった可能性、抗体反応と酵素活性の相違、検体保存期間が統一されていなかったこと（免疫染色側の問題）、などが考えられた。また、偽陽性症例（免疫染色が陰性であったが、蛍光画像では反応ありと判定された 11 例）が多い原因として、gGlu-HMRG が GGT1 以外の subtype (GGT 5, 6, 7) の GGT に反応している可能性が考えられた。組織型に分けて再検討を行うと、蛍光画像の解析と同様に、腺癌に有意に GGT1 の発現が高いことが示された (Figure 4-11)

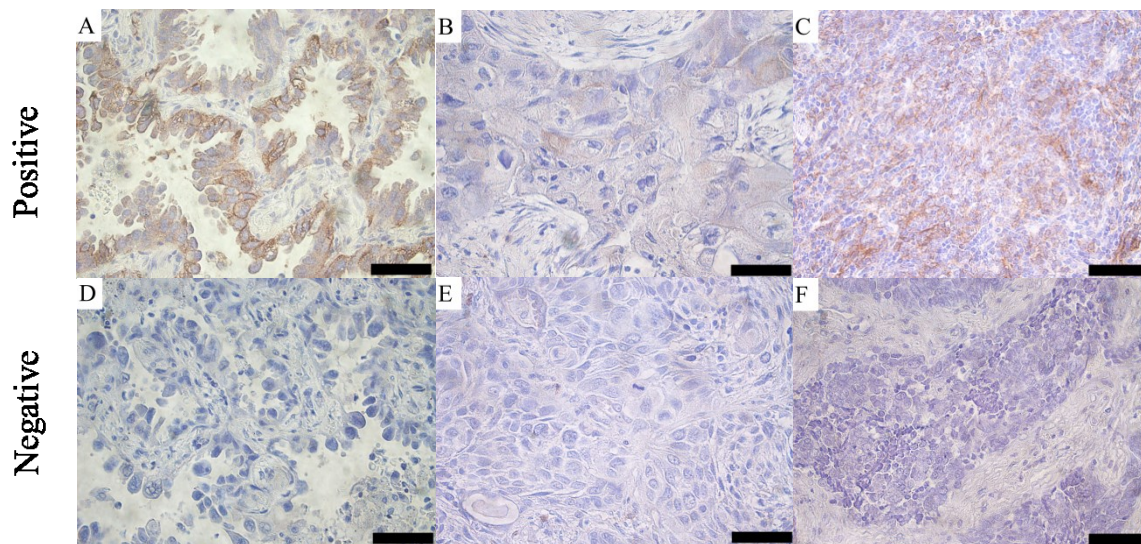


Figure 4-10. Immunohistochemical staining for GGT1 positive and negative study.

A, D:Adenocarcinoma B, E:Squamous cell carcinoma C:Large cell neuroendocrine carcinoma
F:Small cell carcinoma Scale bar represents 50 μ m.

Immunohistochemical staining for GGT1				
Fluorescence image of gGlu-HMRG		Positive	Negative	All
	Positive	21	11	32
	Negative	12	29	41
	All	33	40	73

Table 4-5. Summary of Fluorescence imaging of gGlu-HMRG and Immunohistochemical staining for GGT1. $p < 0.005$

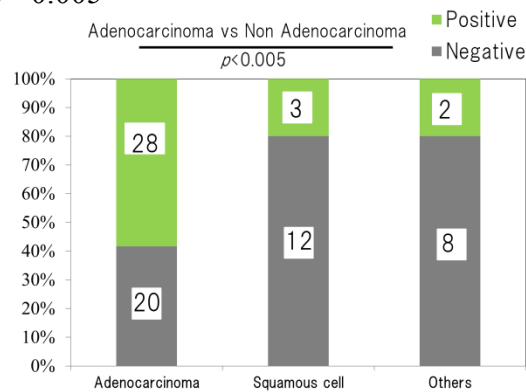


Figure 4-11. Result of immunohistochemical staining among histology.

[小括 2]

- ・ 原発性肺癌 73 症例について gGlu-HMRG を適用し、蛍光画像を解析した結果、30 分後の画像を用いた検討において、感度 43.8% (32/73)、特異度 84.9% (62/73)

であった。

- ・ gGlu-HMRG に反応のあった症例は、臨床病理学的には女性、非喫煙者、腺癌に有意に多い傾向を認めた ($p < 0.05 \sim 0.001$)。また、これらの症例 (19 例) に限定すると感度 78.9% (15/19)、73.7% (14/19) と算出された。

- ・ GGT1 の免疫組織染色による検討から、GGT1 の発現は、蛍光画像の結果と有意に相関し、また非腺癌と比較し腺癌に有意に多い傾向を認めた ($p < 0.005$)。

Discussion

今回使用した gGlu-HMRG は、癌細胞に高発現する GGT1 に酵素反応を受け、高蛍光物質である HMRG が癌細胞に取り込まれて、個々の癌細胞を蛍光画像から認識できることが確かめられた。実際の臨床現場で使用されている他の蛍光イメージングと gGlu-HMRG の比較検討を行うと、まず、肝機能検査にも使用されている ICG が挙げられる。ICG を用いた蛍光イメージングの方法は、原発巣の肺癌やその近傍に局所注入して、肺癌の肺門/縦隔のリンパ節転移をイメージングすることに活用されている [5]。その中でも特にセンチネルリンパ節の同定には有用とされ、肺癌での報告をはじめ、今後さらに幅広い応用が期待されている。その特性は、癌細胞特異的な反応ではなく、原発巣から最初に流れるリンパ流路を同定するものとして使用され、リンパ節内に少数の癌細胞が転移していた場合でも蛍光イメージングが可能とされる。しかし、リンパ節転移が多数ある症例では、通常のリンパ流路が多数の癌細胞で埋まり、正常なリンパ流路が破壊され、ICG が必ずしもセンチネルリンパ節に届かない可能性があり、この方法の限界、課題とされている。

その他に癌の蛍光イメージングとして使用される蛍光物質として、5-ALA が挙げられる [6]。これは、癌細胞と正常組織のポルフィリン代謝の違いから、癌細胞にプロトポルフィリンIXが蓄積する性質を利用して癌の蛍光イメージングを行う。主に脳神経外科領域において、悪性神経膠腫の術中における腫瘍組織の可視化に使用されている。手術数時間前に 5-ALA を経口投与して、手術中に癌細胞に集積したプロトポルフィ

リンIXを蛍光としてとらえ、癌の取り残さないよう補助診断として利用される。高い感度、特異度からその効果が今後期待されているが、光線過敏症などの副作用の問題もあり、注意が必要とされる。そこで今回用いた gGlu-HMRG の特性について考えると、これらの癌の蛍光イメージングにはない特徴を備えている。それは、癌細胞の存在が疑われる局所へ滴下投与し、癌に高発現している酵素を利用して癌の蛍光イメージングを行うものである。その反応の速さは数分単位であることやミリ単位の微小病変までも可視化できるという特徴である。組織の深いところに存在する癌や、GGT 活性のない癌のイメージングは投与方法、蛍光波長の観点から困難であるが、表層に局在し、GGT 活性を有する癌細胞であれば、1 mm 以下でも短時間で蛍光イメージングが可能である。このように癌のイメージングが可能な方法は他にはなく、gGlu-HMRG を臨床に使用するには、この特徴に即した応用が期待されている。

Glu-HMRG を用いた肺癌の蛍光イメージングを行った臨床像について考察する。肺癌 73 例における蛍光イメージングを行い、その診断率は感度 43.8%、特異度 87.4%であり、特に女性、非喫煙者、腺癌の症例で蛍光イメージングできる症例が有意に多いことが確認された。こうした症例は、GGT 遺伝子発現と関連性が示唆された。これまで肺癌と GGT 発現について考察した報告例は 1 例のみであった。Hanigan et al. は肺癌 44 例について GGT の免疫染色を行い、陽性例は 22 例あり、内訳では腺癌が 18 例と最も多い組織型であると報告している[11]。これは本研究と同様な傾向であり、妥当な結果と考えられた。多様な遺伝子変異や組織型を有する肺癌の、約半

数において、1つの酵素である GGT が高発現でしていることは興味深いことであり、今後さらなる詳細な検討が望まれた。GGT の局在については、通常は膜上であるとされているが[9, 10]、Hanigan et al. は、一部の低分化腺癌では細胞質、膜状の両者に存在することを報告している[11]。我々の知見においても、GGT1 免疫染色の結果から腺癌では主に膜上に存在していたが、扁平上皮癌やその他の組織型において、細胞質に陽性となる症例が少数ながら存在していた。この局在による違いが、扁平上皮癌やその他の組織型においてイメージングできる症例が少ない原因の1つである可能性が推測された。組織型による局在の違いについては、今後更なる症例の蓄積が必要と考えられた。

第5章

総括、今後の課題・展望

第5章 総括、今後の課題・展望

第1節 総括

ペプチダーゼプローブである gGlu-HMRG を用いて、肺癌の蛍光イメージングの妥当性について検討を行った。肺癌細胞株において、GGT1 の発現の高い腺癌（A549, H441）と大細胞癌（H460）では、蛍光イメージングから癌細胞を認識できたが、GGT1 の発現の低い小細胞癌（H82）、扁平上皮癌（H226）では、蛍光を認識することができなかった。肺癌モデルマウスの検討では、胸膜播種病変、肺門・縦隔リンパ節転移といった微小癌を 15 分程度の時間で検出することができ、生体での応用の可能性が示された。そして、肺癌手術検体（73 例）の検討において、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングの肺癌検出率は、感度 43.8% (32/73)、特異度 84.9% (62/73) と算出され、GGT 活性をもつ肺癌の割合を反映していると考えられた。臨床病理学的な検討では、女性、腺癌、非喫煙者に有意に反応する症例が多いことが明らかとなった。そこで、女性かつ腺癌かつ非喫煙者の 19 例に限定すると、感度 78.9%(15/19)、特異度 73.7% (14/19) と算出され、症例を選別することで gGlu-HMRG が有効に使用できる可能性が示された。また GGT1 の免疫染色による検討では、gGlu-HMRG を用いた癌の蛍光イメージングと有意に相関することも確かめられた。しかし、肺癌全体での感度が低く、男性、喫煙者、非腺癌には蛍光が上昇しない症例が多いため、症例を選択して使用する必要がある。

第2節 今後の課題・展望

今回使用した蛍光プローブである gGlu-HMRG には、いくつかの課題も残している。蛍光団である HMRG の蛍光波長は、500 nm 台であり、表層に存在する癌のイメージングには適しているが、深部にある癌（ヒトリンパ節の転移、肺実質内の肺癌）のイメージングには適していない。また、GGT 高発現の肺癌は手術検体の約半数ほどであるため、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングが実施できる症例は限られている。さらに、プローブ自体の毒性の問題や蛍光胸腔鏡の開発などの課題もある。しかしながら、今回の検討から gGlu-HMRG は、微量な肺癌細胞を迅速に検出し、診断できるツールとして、他にはない補助診断方法としてその意義は十分あると考えられる。こうした課題の克服について述べると、深部に局在する癌の蛍光イメージングについては、さらに長波長（600～700 nm）の蛍光団を用いた probe の開発が必要とされる。また、gGlu-HMRG の感度が低いことに関しては、手術前の生検検体などであらかじめプローブとの反応を確かめることができれば、このプローブが使える症例を絞り込むことも可能と考えられた。イメージング可能な症例を増やすために、他の酵素をターゲットとしたペプチダーゼプローブの創製も期待された。

ペプチダーゼプローブである gGlu-HMRG の呼吸器外科領域に臨床応用する方法について3つ例を挙げ、考察を加える。1つの方法としては、肺切除断端に遺残した微小癌を診断するための使用が挙げられる。背景として、近年80歳以上の高齢者や低肺機能の肺癌症例、末梢型早期肺癌に対して、胸腔鏡下に肺部分切除や区域切

除といった縮小手術を選択する症例が増加傾向にある [18-21]。こうした手術症例において、局所再発が問題となっている。過去の報告によると、局所再発率は、1.1～17.2%（中央値 6.0%）とされ、決して少なくない [22-27]。その原因として、マージンの確保や肺門リンパ節の評価が不十分であることが挙げられる。そこで局所再発、特に断端再発を減らす方法がいくつか報告されてきた。Matthew, et al.、Sawabata, et al. は、マージンと腫瘍径との比（margin/tumor ratio）が 1 を下回る症例は、1 を超える症例と比較し有意に断端再発が増加することを報告している [32,33]。また Sawabata, et al. は、前者の 5 年生存率が有意に不良であったことも報告している [34]。すなわち、十分なマージン確保が断端再発を予防する重要な方法の 1 つであること示している。しかし、低肺機能症例などには、肺機能を温存して、肺切除量をできる限り少なくし、かつ根治度の高い術式が期待されている。そこで肺切離断端に、このペプチダーゼプローブが使用できれば、遺残した微小な癌細胞を同定する補助診断として活用し、できるだけ肺を残し、呼吸機能の損失にも配慮した術式の変更など適切な治療が行える可能性があると考えられる。

現在、肺切離断端の微小癌を診断する方法として、細胞診を用いる方法が報告されている。その 1 つとして、手術中に肺切除に使用したステープラー（自動縫合器）や切除標本そのものを生理食塩水で洗浄し、細胞診にて癌細胞を検出する方法が知られている。Higashiyama, et al. は 11/112 検体（10%）が陽性と判断され、そのうち追加切除を行った 4 例には再発を認めなかったが、追加治療を行わなかった 3 例はそ

の後再発したと報告している [35]。また、Sawabata, et al. は肺切除断端にガラススライドを直接擦り付けて、細胞診として診断する方法を報告し、15 例中 7 例に陽性例があり、その 7 例のうち 4 例に局所再発を認めたとしている [36]。肉眼的には完全切除した症例の中には、肉眼では見えない微小癌が肺切離面に遺残しているため、局所再発を起こしていると考えられている。こうした細胞診を用いる方法は、確実ではあるが、その分手間や時間がかかり手技が煩雑であるという欠点もある。そこで、表層にある微小癌を検出することが目的であれば、ペプチダーゼ蛍光プローブを用いた癌イメージングは最適な方法であり、迅速に微小癌の同定ができ、術式の変更や治療成績の改善が期待できると思われる。

2 つ目の方法として、微小な胸腔内播種病変の検出に用いることが挙げられる。現在、胸腔内の微小癌検出には、50～100 ml の生理食塩水で胸腔内を洗浄する胸腔内洗浄細胞診（Pleural lavage cytology : PLC）を行うことが一般的である。これまでの報告では、肺癌手術症例のうち 3.6-7.8% に陽性と診断され、5 年生存率は、PLC 陰性例が 57.8～67% に対して、PLC 陽性例は、28～35.9% と有意に予後不良であるとされる [37-39]。こうした微小癌の検出は、有効な方法の 1 つであるが、局在までの同定は困難であり、より正確な診断方法が期待されている。ペプチダーゼ蛍光プローブを用いた癌の蛍光イメージングは、胸腔内の早期微小播種病変を同定できる可能性があり、今まででは診断のつかないような微小癌に対して、診断がつき、治療できる可能性がある。この診断方法を適切に使用できれば、再発率を減少させるだけでなく、再発後

の追加治療、手術といった身体的、精神的負担を減らし、さらには肺癌全体の予後改善につながることも期待できる。

3つ目の方法として、中枢気道に発生する早期扁平上皮癌の検出が挙げられる。

通常では、気管支鏡で気管・気管支の内腔を、白色光にて観察を行い、不整な粘膜面から生検を行い、診断をつけているが、病変の大きさは1 cm 前後と小さく、癌の境界も不明瞭であるため、診断自体は困難を極める。最近では、自家蛍光を利用した気管支鏡なども開発され、診断率を向上させる試みもされている。すなわち、癌組織が正常組織よりも自家蛍光が弱い性質を利用して、画像診断に反映させている。

Kusunoki, et al.は、通常の白色光を用いた気管支鏡の前癌病変を含めた早期肺癌

(carcinoma in situ) の診断率は、感度 61.2%、特異度 85%であるのに対し、Laser-induced fluorescence endoscopy を用いることで、感度 89.8%、特異度 78.4%となり、両者を併用することで、検出率の向上が期待できると報告している [40]。ただし、病変部の蛍光が減弱となる画像では、境界部分が不明瞭になり、認識しにくいと思われる。そこで、これまで検討したペプチダーゼプローブを気管支鏡を通して、病変部近傍に滴下・噴霧して、蛍光画像で観察できれば、通常の白色光では見逃してしまうような微小な早期肺癌であっても、癌細胞の強い蛍光性からさらに癌と正常部位の境界をより明瞭に認識できる可能性があると考えられた。

以上3つの具体的な診断法への応用は、外科・内科を問わず期待される診断方法であり、これまで見えてこなかった癌の広がり、分布をペプチダーゼプローブ

と蛍光イメージングによって十分とらえられる可能性がある。また、この蛍光画像を補助診断として活用して、癌の浸潤範囲が同定できるとすれば、切除・治療する範囲を見極め、最適な治療法の選択に結びつき、治療成績の改善までも期待された。

肺癌に対する外科手術手技は、開胸手術から胸腔鏡手術へと時代の変遷を経て、少しずつ発展、進化しており、現在ではロボット手術が導入され、今後の進歩が期待されている。その中でも蛍光プローブを用いた新しい技術は、早期に臨床応用されることが期待された。

参考文献

- [1] Te Velde EA, Veerman T, Subramaniam V, Ruers T. The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology. *Eur J Surg Oncol* 36:6-15;2010.
- [2] Zhang H, Fan J, Wang J, Zhang S, Dou B, Peng X. An off-on COX-2-specific fluorescent probe: targeting the Golgi apparatus of cancer cells. *J Am Chem Soc* 135:11663-9;2013.
- [3] Li Z, Li X, Gao X, Zhang Y, Shi W, Ma H. Nitroreductase detection and hypoxic tumor cell imaging by a designed sensitive and selective fluorescent probe, 7-[(5-nitrofuran-2-yl)methoxy]-3H-phenoxazin-3-one. *Anal Chem* 85:3926-32;2013.
- [4] Koyama Y, Hama Y, Urano Y, Nguyen DM, Choyke PL, Kobayashi H. Spectral fluorescence molecular imaging of lung metastases targeting HER2/neu. *Clin Cancer Res* 13:2936-45;2007.
- [5] Yamashita S, Tokuishi K, Miyawaki M, Anami K, Moroga T, Takeno S, Chujo M, Yamamoto S, Kawahara K. Sentinel node navigation surgery by thoracoscopic fluorescence imaging system and molecular examination in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* 19:728-33;2012.
- [6] Zhao S, Wu J, Wang C, Liu H, Dong X, Shi C, Shi C, Liu Y, Teng L, Han D, Chen X, Yang G, Wang L, Shen C, Li H. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 8:e63682;2013.

- [7]Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, Ogawa M, Mitsunaga M, Asanuma D, Kamiya M, Young MR, Nagano T, Choyke PL, Kobayashi H. Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med* 23:110-119;2011
- [8]Hanigan MH, Frierson HF Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *Histochem Cytochem* 44:1101-8;1996.
- [9]Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol* 71:231-8; 2006.
- [10]Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, Sneddon TP. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet* 123:321-32;2008.
- [11]Hanigan MH, Frierson HF Jr, Swanson PE, De Young BR. Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors. *Hum Pathol* 30:300-5;1999.
- [12]Corti A, Franzini M, Paolicchi A, Pompella A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer Res* 30:1169-81;2010.
- [13]Hanigan MH. gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 111-112:333-42;1998.
- [14]Pompella A, Corti A, Paolicchi A, Giommarelli C, Zunino F. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 7:360-6;2007.
- [15]Braun L, Goyette M, Yaswen P, Thompson NL, Fausto N, Growth in culture and

tumorigenicity after transfection with the ras oncogene of liver epithelial cells from carcinogen-treated rats. *Cancer Res* 47:4116-24;1987.

[16] Pankiv S, Møller S, Bjorkoy G, Moens U, Huseby NE, Radiationinduced upregulation of gamma-glutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway. *Biochim Biophys Acta* 1760:151-7;2006.

[17] 平成 24 年人口動態統計月報年計（概数）の概況 厚生労働省

[18] Ohtaki Y, Shimizu K. Anatomical thoracoscopic segmentectomy for lung cancer.

Gen Thorac Cardiovasc Surg 2014 May 3. [Epub ahead of print]

[19] Leshnower BG, Miller DL, Fernandez FG, Pickens A, Force SD. Video-assisted thoracoscopic surgery segmentectomy: a safe and effective procedure. *Ann Thorac Surg* 89:1571-6;2010.

[20] Atkins BZ, Harpole DH Jr, Mangum JH, Toloza EM, D'Amico TA, Burfeind WR Jr.

Pulmonary segmentectomy by thoracotomy or thoracoscopy: reduced hospital length of stay with a minimally-invasive approach. *Ann Thorac Surg* 84:1107-12;2007. discussion 1112-3.

[21] Yano T, Yokoyama H, Yoshino I, Tayama K, Asoh H, Hata K, Ichinose Y. Results of a limited resection for compromised or poor-risk patients with clinical stage I non-small cell carcinoma of the lung. *J Am Coll Surg* 181:33-7;1995.

[22] Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg*

60:615-22;1995. discussion 622-3.

[23] Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, Ginsberg RJ.

Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 109:120-9;1995.

[24] Nomori H, Mori T, Ikeda K, Yoshimoto K, Iyama K, Suzuki M. Segmentectomy for selected cT1N0M0 non-small cell lung cancer: a prospective study at a single institute.

J Thorac Cardiovasc Surg 144:87-93;2012.

[25] Okada M, Koike T, Higashiyama M, Yamato Y, Kodama K, Tsubota N. Radical sublobar resection for small-sized non-small cell lung cancer: a multicenter study.

J Thorac Cardiovasc Surg 132:769-75;2006.

[26] Okada M, Mimae T, Tsutani Y, Nakayama H, Okumura S, Yoshimura M, Miyata Y.

Segmentectomy versus lobectomy for clinical stage IA lung adenocarcinoma. Ann Cardiothorac Surg 3:153-9;2014.

[27] El-Sherif A, Gooding WE, Santos R, Pettiford B, Ferson PF, Fernando HC, Urda SJ,

Luketich JD, Landreneau RJ. Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. Ann Thorac Surg 82:408-15;2006. discussion 415-6.

[28] Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and

genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. In: Travis WD,

Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (eds). World Health

Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press, 2004: pp 9–124.

[29] Onn A, Isobe T, Itasaka S, Wu W, O'Reilly MS, Ki Hong W, Fidler IJ, Herbst RS. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. Clin Cancer Res. 9:5532-9;2003.

[30] Cui ZY, Ahn JS, Lee JY, Kim WS, Lim HY, Jeon HJ, Suh SW, Kim JH, Kong WH, Kang JM, Nam do H, Park K. Mouse orthotopic lung cancer model induced by PC14PE6. Cancer Res Treat. 38:234-9;2006.

[31] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, lung and pleural tumours. In: Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors; UICC International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th edn. Oxford:Wiley-Blackwell, 2009; pp 138-46.

[32] Schuchert MJ, Pettiford BL, Keeley S, D'Amato TA, Kilic A, Close J, Pennathur A, Santos R, Fernando HC, Landreneau JR, Luketich JD, Landreneau RJ. Anatomic segmentectomy in the treatment of stage I non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg 84:926-32;2007. discussion 932-3.

[33] Sawabata N, Ohta M, Matsumura A, Nakagawa K, Hirano H, Maeda H, Matsuda H; Thoracic Surgery Study Group of Osaka University. Optimal distance of malignant negative margin in excision of nonsmall cell lung cancer: a multicenter prospective study. Ann Thorac Surg 77:415-20;2004.

- [34] Sawabata N, Maeda H, Matsumura A, Ohta M, Okumura M; Thoracic Surgery Study Group of Osaka University. Clinical implications of the margin cytology findings and margin/tumor size ratio in patients who underwent pulmonary excision for peripheral non-small cell lung cancer. *Surg Today* 42:238-44;2012.
- [35] Higashiyama M, Kodama K, Takami K, Higaki N, Nakayama T, Yokouchi H. Intraoperative lavage cytologic analysis of surgical margins in patients undergoing limited surgery for lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125:101-7;2003.
- [36] Sawabata N, Matsumura A, Ohota M, Maeda H, Hirano H, Nakagawa K, Matsuda H; Thoracic Surgery Study Group of Osaka University. Cytologically malignant margins of wedge resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 74:1953-7;2002.
- [37] Ichinose Y, Tsuchiya R, Yasumitsu T, Koike T, Yamato Y, Nakagawa K, Tada H, Yokoi K, Nagai K, Kase M; Lung Cancer Surgical Study Sub-Group of the Japan Clinical Oncology Group. Prognosis of non-small cell lung cancer patients with positive pleural lavage cytology after a thoracotomy: results of the survey conducted by the Japan Clinical Oncology Group. *Lung Cancer* 31:37-41;2001.
- [38] Okada M, Sakamoto T, Nishio W, Uchino K, Tsuboshima K, Tsubota N. Pleural lavage cytology in non-small cell lung cancer: lessons from 1000 consecutive resections. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:1911-5;2003.
- [39] Mazza F, Ferrari E, Maineri P, Dozin B, Ratto GB. Pleural lavage cytology predicts

recurrence and survival, even in early non-small cell lung cancer. Surg Today May 10 2014.

[Epub ahead of print]

[40] Kusunoki Y, Imamura F, Uda H, Mano M, Horai T. Early detection of lung cancer with laser-induced fluorescence endoscopy and spectrofluorometry. Chest 118(6):1776-82;2000.

研究倫理申請

倫理申請 2016：共同的ながん研究のための臨床検体の管理・保存体制の確立

倫理申請 3900：肺および縦隔腫瘍における癌特異的蛍光プローブの有用性及び新規
プローブ開発に関する研究

倫理申請 10322：癌特異的蛍光プローブの有用性及び新規プローブ開発に関する研究
(ヒト血清使用に関する倫理申請)

学会発表

2013 年 2 月 6 日 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ (滋賀)

「肺悪性腫瘍に対する癌特異的蛍光プローブの適用と開発～肺癌モデルマウスでの
検討」日野春秋、神谷真子、浦野泰照

2013 年 3 月 29 日 第 133 回薬学会総会 (横浜)

「肺悪性腫瘍に対する癌特異的蛍光プローブの適用～肺癌モデルマウスでの検討」
日野春秋、神谷真子、浦野泰照

2014 年 1 月 31 日 文部科学省新学術領域 公開シンポジウム (東京)

「肺悪性腫瘍に対する癌特異的蛍光プローブの適用と開発～肺癌モデルマウスでの
検討」日野春秋、神谷真子、浦野泰照

2014 年 3 月 28 日 第 134 回薬学会総会 (熊本)

「肺悪性腫瘍に対する癌特異的蛍光プローブの開発と適用」
日野春秋、神谷真子、中島 淳、浦野泰照

2014 年 5 月 22～23 日 第 9 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (大阪)

「肺悪性腫瘍に対する癌特異的蛍光プローブの開発と適応」
日野春秋、神谷真子、中島 淳、浦野泰照

2014 年 5 月 29～30 日 第 31 回日本呼吸器外科学会総会 (東京)

「肺悪性腫瘍に対する癌特異的蛍光プローブの開発と適用」
日野春秋、唐崎隆弘、村山智紀、一瀬淳二、井上雄太、北野健太郎、長山和弘、
似鳥純一、安樂真樹、村川知弘、神谷真子、浦野泰照、中島淳

2014 年 9 月 30～10 月 3 日 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会 (福岡)

「肺悪性腫瘍に対する蛍光プローブの開発と適応：肺癌モデルマウスでの検討」
日野春秋、唐崎隆弘、村山智紀、一瀬淳二、井上雄太、北野健太郎、長山和弘、
似鳥純一、安樂真樹、村川知弘、神谷真子、浦野泰照、中島淳

謝辞

本研究を行うにあたり、下記の先生方のご協力をいただきましたことに

御礼申し上げます

qRT-PCR での GGT1 mRNA 相対量解析

- ・ 宮園浩平 教授（東京大学大学院医学系研究科）
- ・ 田中さやか 博士（岡山大学大学院薬学系研究科）

肺癌モデルマウスの作成

- ・ 片岡一則 教授（東京大学大学院工学系研究科）
- ・ 西山伸宏 教授（東京工業大学資源化学研究所高分子材料部門）
- ・ 水野和恵 博士（東京大学大学院工学系研究科）

肺癌細胞株、肺癌モデルマウス、手術検体のイメージングに関する機器提供、指導

プローブの提供

- ・ 浦野泰照 教授（東京大学大学院医学系研究科、薬学系研究科）
- ・ 神谷真子 博士（東京大学大学院医学系研究科）

研究全般の指導

- ・ 中島 淳 教授（東京大学医学部附属病院呼吸器外科）